

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

cited in the European Search
Report of EP 99 10 6556.6
Your Ref.: *U9C-112975 C/EH*



AM

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/53, 15/11, 15/82, 9/02, A01H 5/00		A2	(11) Numéro de publication internationale: WO 95/27790
			(43) Date de publication internationale: 19 octobre 1995 (19.10.95)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/00465		(81) Etats désignés: AU, BR, CA, JP, NZ, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Date de dépôt international: 11 avril 1995 (11.04.95)			
(30) Données relatives à la priorité: 94/04246 11 avril 1994 (11.04.94) FR		Publiée <i>Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.</i>	
(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75016 Paris (FR).			
(72) Inventeurs; et			
(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BOUDET, Alain [FR/FR]; 18, rue Caubère, F-31400 Toulouse (FR). PET-TENATI, Jacqueline [FR/FR]; Rue de la Halle, F-31450 Fourquevaux (FR). GOFFNER, Deborah [US/FR]; Chemin de l'Ariège, F-31320 Vielle Toulouse (FR).			
(74) Mandataires: DEMACHY, Charles etc.; Grosset-Fournier & Demachy s.a.r.l., 103, rue La Fayette, F-75010 Paris (FR).			
(54) Title: DNA SEQUENCES CODING FOR A CYNAMOYL CoA REDUCTASE AND THEIR USE IN THE REGULATION OF PLANT LIGNIN CONCENTRATIONS			
(54) Titre: SEQUENCES D'ADN CODANT POUR UNE CINNAMOYL CoA REDUCTASE, ET LEURS APPLICATIONS DANS LE DOMAINE DE LA REGULATION DES TENEURS EN LIGNINES DES PLANTES			
(57) Abstract			
DNA sequences comprising, as coding region, all or part of the nucleotide sequence coding for an mRNA coding for a cinnamoyl CoA reductase (CCR), or all or part of the complementary nucleotide sequence thereof and coding for an anti-sense mRNA capable of hybridizing with the above-mentioned mRNA. The invention also concerns the use of said sequences for carrying out methods of regulation of plant lignin biosynthesis.			
(57) Abrégé			
La présente invention concerne toute séquence d'ADN comprenant à titre de région codante, tout ou partie de la séquence nucléotidique codant pour un ARNm codant pour une cinnamoyl CoA réductase (CCR), ou tout ou partie de la séquence nucléotidique complémentaire de cette dernière et codant pour un ARNm antisens susceptible de s'hybrider avec l'ARNm susmentionné. L'invention vise également l'utilisation des séquences susmentionnées pour la mise en œuvre de procédés de régulation de la biosynthèse de lignines chez les plantes.			

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

- 1 -

SEQUENCES D'ADN CODANT POUR UNE CINNAMOYL CoA
REDUCTASE, ET LEURS APPLICATIONS DANS LE DOMAINE DE
LA REGULATION DES TENEURS EN LIGNINES DES PLANTES.

5

La présente invention a pour objet l'utilisation de séquences d'ADN codant pour une cinnamoyl CoA réductase (CCR) chez les plantes, ou de tout fragment de ces séquences, ou encore de toute séquence dérivée de ces dernières, ou de leurs séquences complémentaires, dans le cadre de la mise en oeuvre de procédés de régulation du taux de lignine chez les plantes.

10

La lignine est un polymère aromatique hétérogène complexe qui imperméabilise et renforce les parois de certaines cellules des plantes.

15

La lignine est formée par polymérisation de radicaux libres dérivant de monolignols tels que les alcools paracoumarylique, coniférylique et sinapylique (Higuchi, 1985, in Biosynthesis and degradation of wood components (T. Higuchi, ed), Academic Press, Orlando, FL, pp. 141-160).

Les lignines présentent une grande variation dans leur contenu relatif en monolignols, en fonction des espèces, et des différents tissus au sein d'une même plante.

20

Cette variation est probablement due et contrôlée par les différentes activités et spécificités de substrats, des enzymes nécessaires à la biosynthèse des monomères de la lignine (Higuchi, 1985, susmentionné).

25

Au-delà de son rôle dans la structure et le développement des plantes, la lignine représente un composant majeur de la biomasse terrestre et revêt une grande importance économique et écologique (Brown, 1985, J. Appl. Biochem. 7, 371-387; Whetten and Sederoff, 1991, Forest Ecology and Management, 43, 301-316).

30

Sur le plan de l'exploitation de la biomasse, il convient tout d'abord de noter que la lignine est un facteur limitant de la digestibilité et du rendement nutritionnel des plantes fourragères. En effet, il est clairement démontré que la digestibilité des plantes fourragères par les ruminants, est inversement proportionnelle à la teneur en lignines de ces plantes. La nature des lignines étant également un facteur déterminant dans ce phénomène (Buxton and Roussel, 1988, Crop. Sci., 28, 553-558; Jung and Vogel, 1986, J. Anim. Sci., 62, 1703-1712).

35

Parmi les principales plantes fourragères chez lesquelles il serait intéressant de diminuer les teneurs en lignines, on peut citer: luzerne, fétuque, maïs, fourrage utilisé en ensilage...

- 2 -

Notons également que des teneurs en lignines élevées sont en partie responsables de la qualité limitée des tourteaux de tournesol destinés à l'alimentation du bétail, et de la diminution des capacités germinatives de certaines semences dans le domaine de l'horticulture.

5 On peut souligner également que la lignification intense qui se produit lors de la conservation des organes végétaux après récolte, rend rapidement impropres à la consommation, des productions telles que l'asperge, l'igname, les carottes, etc...

10 Par ailleurs, il convient de noter également que plus de 50 millions de tonnes de lignines sont extraites de la matière ligneuse chaque année dans le cadre de la production de la pâte à papier dans l'industrie papetière. Cette opération d'extraction nécessaire à l'obtention de la cellulose est énergétiquement coûteuse et secondairement polluante à travers les composés chimiques mis en jeu pour l'extraction et que l'on retrouve dans
15 l'environnement (Dean and Eriksson, 1992, *Holzforschung*, 46, 135-147; Whetten and Sederoff, 1991, susmentionné).

Réduire les proportions en lignines (qui selon les espèces, représentent de 20 à 30% de la matière sèche) de quelques pour cents (2 à 5%), représenterait un gain de rendement, une économie substantielle (produits
20 chimiques) et contribuerait à l'amélioration de l'environnement (réduction des pollutions). Etant donné les échelles d'utilisation de la matière ligneuse, ces retombées auraient des répercussions extrêmement importantes. Dans ce cas, les espèces concernées pourraient être le peuplier, l'eucalyptus, l'*Acacia mangium*, le genre *Casuarina* et l'ensemble des angiospermes et
25 gymnospermes utilisés pour la production de pâte à papier.

Il est clair que, dans les deux domaines considérés, la réduction des taux de lignines doit être modérée pour conserver à la plante (ou à l'arbre) ses caractéristiques de rigidité et son architecture normale puisque les lignines qui consolident les parois cellulaires jouent un rôle important dans le maintien du
30 port dressé des végétaux.

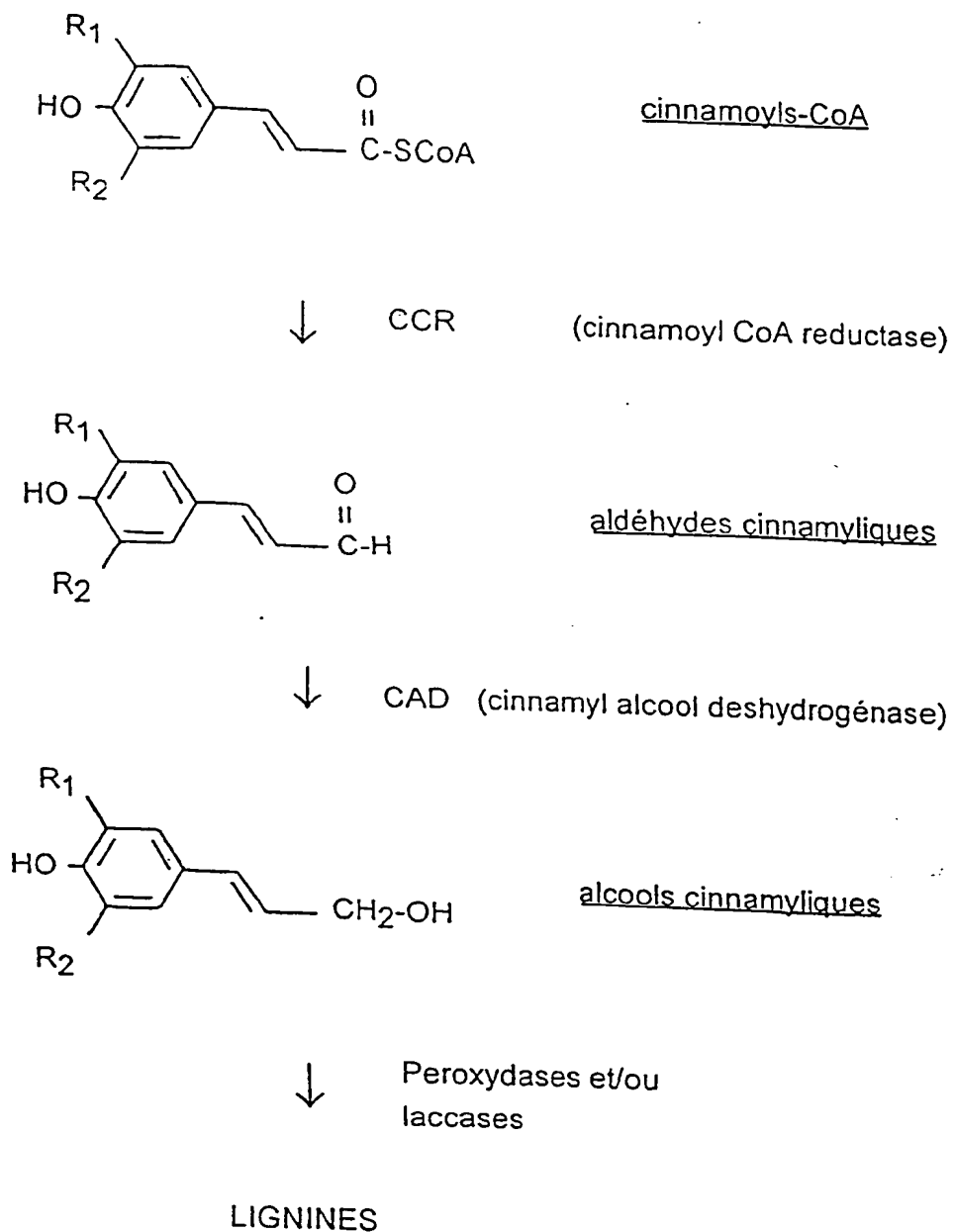
Les variations naturelles dans les teneurs en lignines observées dans la nature pour une même espèce (écarts pouvant aller jusqu'à 6-8% de la masse sèche entre individus) autorisent les diminutions évoquées plus haut.

La résistance à la dégradation de la lignine, de même que les difficultés
35 que l'on rencontre dans le cadre de son extraction, sont probablement dues à la structure complexe de ce polymère constitué de liaisons éther et carbone-carbone entre les monomères, ainsi qu'aux nombreuses liaisons chimiques existant entre la lignine et d'autres composants de la paroi cellulaire (Sarkanen

- 3 -

and Ludwig, 1971, in *Lignins: Occurrence, Formation, Structure and Reactions* (K.V. Sarkanen and C.H. Kudwig eds) New York: Wiley - Interscience, pp. 1-18).

5 Partant des cinnamoyls-CoA, la biosynthèse des lignines chez les plantes, est effectuée de la manière suivante:



- 4 -

Une approche, par voie de génie génétique, pour tenter de réduire le taux de lignines chez les plantes, consisterait à inhiber la synthèse d'une des enzymes de la chaîne de la biosynthèse de ces lignines indiquées ci-dessus.

5 Une technique particulièrement appropriée dans le cadre d'une telle approche, est celle de l'utilisation d'ARNm antisens susceptible de s'hybrider avec l'ARNm codant pour ces enzymes, et par conséquent, d'empêcher, pour le moins partiellement, la production de ces enzymes à partir de leur ARNm correspondant.

10 Un telle stratégie antisens, réalisée à l'aide du gène codant pour la CAD chez le tabac, a fait l'objet de la demande de brevet européen n° 584 117, décrivant l'utilisation d'ARNm antisens susceptible d'inhiber la production de lignines chez les plantes en s'hybridant à l'ARNm codant pour la CAD chez ces plantes.

15 Les résultats au niveau des plantes ainsi transformées démontrent une réduction de l'activité de la CAD, mais paradoxalement, les teneurs en lignines ne montrent pas d'évolution. Des études complémentaires indiquent que les lignines de plantes transformées sont différentes des lignines témoins, car les aldéhydes cinnamylques sont directement incorporés dans le polymère lignine.

20 L'un des buts de la présente invention est précisément celui de fournir un procédé permettant de réguler efficacement les teneurs en lignines dans les plantes, soit dans le sens d'une diminution sensible de ces teneurs par rapport aux teneurs normales dans les plantes, soit dans le sens d'une augmentation de ces teneurs.

25 Un autre but de la présente invention est de fournir les outils pour la mise en oeuvre d'un tel procédé, et plus particulièrement des constructions utilisables pour la transformation de plantes.

30 Un autre but de la présente invention est de fournir des plantes transformées génétiquement, notamment des plantes fourragères susceptibles d'être mieux digérées que les plantes non transformées, ou encore des plantes ou arbres transformés pour la production de la pâte à papier, et dont l'extraction des lignines serait facilitée et moins polluante que dans le cas d'arbres non transformés.

35 Un autre but de la présente invention est celui de fournir des plantes transformées davantage résistantes à des attaques de l'environnement, notamment à des attaques parasitaires, que ne le sont les plantes non transformées, ou encore des plantes transformées de plus grande taille, ou de taille plus réduite (que celle des plantes non transformées).

- 5 -

La présente invention a pour objet l'utilisation de séquences nucléotidiques recombinantes contenant une (ou plusieurs) région(s) codante(s), cette (ces) région(s) codante(s) étant constituée(s) :

5 - d'une séquence nucléotidique codant pour un ARN messager (ARNm), cet ARNm codant lui-même pour une cinnamoyl CoA réductase (CCR) chez les plantes, ou d'un fragment de la séquence nucléotidique susmentionnée, ce fragment codant pour un ARNm, cet ARNm codant lui-même pour un fragment d'une CCR chez les plantes, ce fragment de CCR présentant une activité enzymatique équivalente à celle de la CCR susmentionnée, ou d'une
10 séquence nucléotidique dérivée de la séquence nucléotidique susmentionnée, ou dérivée du fragment susmentionné, notamment par mutation et/ou addition, et/ou suppression, et/ou substitution d'un ou plusieurs nucléotides, cette séquence dérivée codant pour un ARNm, cet ARNm codant lui-même pour une protéine dérivée présentant une activité enzymatique équivalente à celle de
15 la CCR susmentionnée, ou

- d'une séquence nucléotidique complémentaire de tout ou partie de la séquence nucléotidique codant pour un ARNm, ou du fragment de cette séquence, ou de la séquence dérivée de ces derniers, tels que définis ci-dessus, cette séquence complémentaire codant pour une séquence nucléotidique
20 antisens (encore désignée ARNm antisens) susceptible de s'hybrider avec l'un des ARNm susmentionnés,

pour la transformation de cellules végétales en vue de l'obtention de plantes transgéniques au sein desquelles la biosynthèse des lignines est régulée soit dans le sens d'une augmentation, soit dans le sens d'une diminution des
25 teneurs en lignines produites, par rapport aux teneurs normales en lignines produites chez les plantes.

Par l'expression "séquence nucléotidique dérivée", dans ce qui précède et ce qui suit, on entend toute séquence présentant au moins environ 50% de nucléotides homologues à ceux de la séquence dont elle dérive.

30 Par "protéine dérivée" dans ce qui précède et ce qui suit, on entend toute protéine présentant au moins environ 50% d'acides aminés homologues à ceux de la protéine dont elle dérive.

Parmi les séquences nucléotidiques susceptibles d'être utilisées à titre de régions codantes dans les séquences nucléotidiques recombinantes, on peut
35 citer principalement:

- la séquence nucléotidique représentée par SEQ ID NO 1, codant pour un ARNm, cet ARNm codant lui-même pour la CCR d'eucalyptus représentée par SEQ ID NO 2,

- 6 -

- la séquence nucléotidique représentée par SEQ ID NO 3, codant pour un ARNm, cet ARNm codant lui-même pour la CCR de peuplier représentée par SEQ ID NO 4,

5 - la séquence nucléotidique représentée par SEQ ID NO 5, codant pour un ARNm, cet ARNm codant lui-même pour la CCR de fétuque représentée par SEQ ID NO 6,

- la séquence nucléotidique représentée par SEQ ID NO 7, codant pour un ARNm, cet ARNm codant lui-même pour la CCR de tabac représentée par SEQ ID NO 8,

10 - la séquence nucléotidique complémentaire de celle représentée par SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 5 ou SEQ ID NO 7, cette séquence complémentaire codant pour un ARNm antisens susceptible de s'hybrider avec l'ARNm codé par les séquences SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 5 et SEQ ID NO 7 respectivement,

15 - la séquence nucléotidique dérivée de la séquence représentée par SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 5 ou SEQ ID NO 7, notamment par mutation et/ou addition, et/ou suppression, et/ou substitution d'un ou plusieurs nucléotides, cette séquence dérivée codant soit pour un ARNm codant lui-même pour la CCR représentée par SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 4, 20 SEQ ID NO 6 ou SEQ ID NO 8 respectivement, ou pour une protéine dérivée de ces dernières et présentant une activité enzymatique équivalente à celle desdites CCR chez les plantes, notamment la séquence nucléotidique dérivée de la séquence SEQ ID NO 1, et représentée par SEQ ID NO 9, cette dernière codant pour un ARNm, cet ARNm codant lui-même pour une protéine 25 représentée par SEQ ID NO 10 dérivée de la CCR d'eucalyptus susmentionnée,

- la séquence nucléotidique dérivée de la séquence nucléotidique complémentaire susmentionnée, par mutation et/ou addition, et/ou suppression, et/ou substitution d'un ou plusieurs nucléotides, cette séquence 30 dérivée codant pour un ARNm antisens susceptible de s'hybrider avec un des ARNm susmentionnés.

La présente invention a plus particulièrement pour objet toute séquence d'ADN, caractérisée en ce qu'elle comprend à titre de région codante:

35 - la séquence nucléotidique représentée par SEQ ID NO 1, codant pour un ARNm, cet ARNm codant lui-même pour la CCR représentée par SEQ ID NO 2, ou

- un fragment de la séquence nucléotidique susmentionnée, ce fragment codant pour un fragment de la CCR représentée par SEQ ID NO 2, ce

- 7 -

fragment de CCR présentant une activité enzymatique équivalente à celle de la CCR susmentionnée, ou

- toute séquence nucléotidique dérivée de la séquence représentée par SEQ ID NO 1 susmentionnée, ou d'un fragment tel que décrit ci-dessus de cette séquence, notamment par mutation et/ou addition, et/ou suppression, et/ou substitution d'un ou plusieurs nucléotides, cette séquence dérivée codant pour un ARNm codant lui-même pour la CCR représentée par SEQ ID NO 2, ou pour une protéine dérivée de cette dernière et présentant une activité enzymatique équivalente à celle de ladite CCR chez les plantes, notamment la séquence nucléotidique dérivée de la séquence SEQ ID NO 1, et représentée par SEQ ID NO 9, cette dernière codant pour un ARNm, cet ARNm codant lui-même pour une protéine représentée par SEQ ID NO 10 dérivée de la CCR d'eucalyptus susmentionnée.

La présente invention a plus particulièrement pour objet toute séquence d'ADN, caractérisée en ce qu'elle comprend à titre de région codante:

- la séquence nucléotidique représentée par SEQ ID NO 3, codant pour ARNm, cet ARNm codant lui-même pour la CCR représentée par SEQ ID NO 4, ou

- un fragment de la séquence nucléotidique susmentionnée, ce fragment codant pour un fragment de la CCR représentée par SEQ ID NO 4, ce fragment de CCR présentant une activité enzymatique équivalente à celle de la CCR susmentionnée, ou

- toute séquence nucléotidique dérivée de la séquence représentée par SEQ ID NO 3, susmentionnée, ou d'un fragment tel que décrit ci-dessus de cette séquence, notamment par mutation et/ou addition, et/ou suppression, et/ou substitution d'un ou plusieurs nucléotides, cette séquence dérivée codant pour un ARNm codant lui-même pour la CCR représentée par SEQ ID NO 4, ou pour une protéine dérivée de cette dernière et présentant une activité enzymatique équivalente à celle de ladite CCR chez les plantes.

La présente invention a plus particulièrement pour objet toute séquence d'ADN, caractérisée en ce qu'elle comprend à titre de région codante:

- la séquence nucléotidique représentée par SEQ ID NO 5, codant pour ARNm, cet ARNm codant lui-même pour la CCR représentée par SEQ ID NO 6, ou

- un fragment de la séquence nucléotidique susmentionnée, ce fragment codant pour un fragment de la CCR représentée par SEQ ID NO 6, ce fragment de CCR présentant une activité enzymatique équivalente à celle de la CCR susmentionnée, ou

- 8 -

- toute séquence nucléotidique dérivée de la séquence représentée par SEQ ID NO 5, susmentionnée, ou d'un fragment tel que décrit ci-dessus de cette séquence, notamment par mutation et/ou addition, et/ou suppression, et/ou substitution d'un ou plusieurs nucléotides, cette séquence dérivée codant pour un ARNm codant lui-même pour la CCR représentée par SEQ ID NO 6, ou pour une protéine dérivée de cette dernière et présentant une activité enzymatique équivalente à celle de ladite CCR chez les plantes.

La présente invention a plus particulièrement pour objet toute séquence d'ADN, caractérisée en ce qu'elle comprend à titre de région codante:

- la séquence nucléotidique représentée par SEQ ID NO 7, codant pour ARNm, cet ARNm codant lui-même pour la CCR représentée par SEQ ID NO 8, ou

- un fragment de la séquence nucléotidique susmentionnée, ce fragment codant pour un fragment de la CCR représentée par SEQ ID NO 8, ce fragment de CCR présentant une activité enzymatique équivalente à celle de la CCR susmentionnée, ou

- toute séquence nucléotidique dérivée de la séquence représentée par SEQ ID NO 7, susmentionnée, ou d'un fragment tel que décrit ci-dessus de cette séquence, notamment par mutation et/ou addition, et/ou suppression, et/ou substitution d'un ou plusieurs nucléotides, cette séquence dérivée codant pour un ARNm codant lui-même pour la CCR représentée par SEQ ID NO 8, ou pour une protéine dérivée de cette dernière et présentant une activité enzymatique équivalente à celle de ladite CCR chez les plantes.

Par protéine présentant une activité enzymatique équivalente à celle des CCR présentes chez les plantes, et plus particulièrement des CCR représentées par SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 6 et SEQ ID NO 8, on entend toute protéine possédant une activité CCR telle que mesurée selon la méthode de Luderitz et Grisebach publiée dans Eur. J. Biochem. (1981), 119: 115-127.

A titre d'illustration, cette méthode est réalisée par mesure spectrophotométrique de l'activité réductrice de la protéine (CCR ou dérivée), en suivant la disparition des cinnamoyl CoA à 366 nm. La réaction se déroule à 30°C, pendant 2 à 10 minutes. La composition du milieu réactionnel est la suivante: tampon phosphate 100 mM, pH 6.25, 0,1 mM NADPH, 70 μ M Feruloyl CoA, 5 à 100 μ l d'extrait enzymatique dans un volume total de 500 μ l.

- 9 -

L'invention a également pour objet toute séquence d'ADN, caractérisée en ce qu'elle comprend à titre de région codante:

5 - la séquence nucléotidique complémentaire de celle représentée par SEQ ID NO 1, cette séquence complémentaire codant pour un ARNm antisens susceptible de s'hybrider avec l'ARNm codant lui-même pour la CCR représentée par SEQ ID NO 2, à savoir l'ARNm codé par la séquence représentée par SEQ ID NO 1, ou codé par une séquence dérivée de cette dernière, telle que définie ci-dessus, ou

10 - un fragment de la séquence complémentaire susmentionnée, ce fragment de séquence codant pour un ARNm antisens susceptible de s'hybrider avec l'ARNm codant lui-même pour la CCR représentée par SEQ ID NO 2, tel que défini ci-dessus, ou

15 - toute séquence nucléotidique dérivée de la séquence complémentaire susmentionnée, ou du fragment de cette séquence complémentaire tel que décrit ci-dessus, notamment par mutation et/ou addition, et/ou suppression, et/ou substitution d'un ou plusieurs nucléotides, cette séquence dérivée codant pour un ARNm antisens susceptible de s'hybrider avec l'ARNm susmentionné, notamment la séquence complémentaire de celle représentée par SEQ ID NO 9.

20 La présente invention a plus particulièrement pour objet toute séquence d'ADN, caractérisée en ce qu'elle comprend à titre de région codante:

25 - la séquence nucléotidique complémentaire de celle représentée par SEQ ID NO 3, cette séquence complémentaire codant pour un ARNm antisens susceptible de s'hybrider avec l'ARNm codant lui-même pour la CCR représentée par SEQ ID NO 4, à savoir l'ARNm codé par la séquence représentée par SEQ ID NO 3, ou codé par une séquence dérivée de cette dernière, telle que définie ci-dessus, ou

30 - un fragment de la séquence complémentaire susmentionnée, ce fragment de séquence codant pour un ARNm antisens susceptible de s'hybrider avec l'ARNm codant lui-même pour la CCR représentée par SEQ ID NO 4, tel que défini ci-dessus, ou

35 - toute séquence nucléotidique dérivée de la séquence complémentaire susmentionnée, ou du fragment de cette séquence complémentaire tel que décrit ci-dessus, notamment par mutation et/ou addition, et/ou suppression, et/ou substitution d'un ou plusieurs nucléotides, cette séquence dérivée codant pour un ARNm antisens susceptible de s'hybrider avec l'ARNm susmentionné.

- 10 -

La présente invention a plus particulièrement pour objet toute séquence d'ADN, caractérisée en ce qu'elle comprend à titre de région codante:

5 - la séquence nucléotidique complémentaire de celle représentée par SEQ ID NO 5, cette séquence complémentaire codant pour un ARNm antisens susceptible de s'hybrider avec l'ARNm codant lui-même pour la CCR représentée par SEQ ID NO 6, à savoir l'ARNm codé par la séquence représentée par SEQ ID NO 5, ou codé par une séquence dérivée de cette dernière, telle que définie ci-dessus, ou

10 - un fragment de la séquence complémentaire susmentionnée, ce fragment de séquence codant pour un ARNm antisens susceptible de s'hybrider avec l'ARNm codant lui-même pour la CCR représentée par SEQ ID NO 5, tel que défini ci-dessus, ou

15 - toute séquence nucléotidique dérivée de la séquence complémentaire susmentionnée, ou du fragment de cette séquence complémentaire tel que décrit ci-dessus, notamment par mutation et/ou addition, et/ou suppression, et/ou substitution d'un ou plusieurs nucléotides, cette séquence dérivée codant pour un ARNm antisens susceptible de s'hybrider avec l'ARNm susmentionné.

La présente invention a plus particulièrement pour objet toute séquence d'ADN, caractérisée en ce qu'elle comprend à titre de région codante:

20 - la séquence nucléotidique complémentaire de celle représentée par SEQ ID NO 7, cette séquence complémentaire codant pour un ARNm antisens susceptible de s'hybrider avec l'ARNm codant lui-même pour la CCR représentée par SEQ ID NO 8, à savoir l'ARNm codé par la séquence représentée par SEQ ID NO 7, ou codé par une séquence dérivée de cette dernière, telle que définie ci-dessus, ou

25 - un fragment de la séquence complémentaire susmentionnée, ce fragment de séquence codant pour un ARNm antisens susceptible de s'hybrider avec l'ARNm codant lui-même pour la CCR représentée par SEQ ID NO 7, tel que défini ci-dessus, ou

30 - toute séquence nucléotidique dérivée de la séquence complémentaire susmentionnée, ou du fragment de cette séquence complémentaire tel que décrit ci-dessus, notamment par mutation et/ou addition, et/ou suppression, et/ou substitution d'un ou plusieurs nucléotides, cette séquence dérivée codant pour un ARNm antisens susceptible de s'hybrider avec l'ARNm susmentionné.

35 Il va de soi que les séquences représentées par SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 7 et SEQ ID NO 9, les séquences complémentaires, les séquences dérivées et les fragments de séquences de

- 11 -

l'invention mentionnées ci-dessus, doivent être pris en considération comme étant représentées dans le sens 5' → 3'.

5 Ainsi, le premier nucléotide d'une séquence complémentaire dans le sens 5' → 3' telle que décrite ci-dessus, est le complément du dernier nucléotide de la séquence dans le sens 5' → 3' codant pour une CCR (ou fragment de CCR ou protéine dérivée), le second nucléotide de cette séquence complémentaire est le complément de l'avant-dernier nucléotide de la séquence codant pour une CCR, et ainsi de suite, jusqu'au dernier nucléotide de ladite séquence
10 complémentaire qui est le complément du premier nucléotide de la séquence codant pour une CCR.

L'ARNm codé par la séquence complémentaire susmentionnée est tel que, lorsque cet ARNm est représenté dans le sens 5' → 3', son premier nucléotide correspond au dernier nucléotide de la séquence codant pour une CCR, et donc s'hybride avec le dernier nucléotide de l'ARNm codé par cette
15 dernière, tandis que son dernier nucléotide correspond au premier nucléotide de la séquence codant pour une CCR, et donc s'hybride avec le premier nucléotide de l'ARNm codé par cette dernière.

Ainsi, on entend par ARNm antisens dans ce qui précède et ce qui suit, tout ARNm codé par la susdite séquence complémentaire et représenté dans le sens inverse (3' → 5') du sens dans lequel est représenté l'ARNm codé par la
20 séquence codant pour une CCR (ou fragment de CCR ou protéine dérivée), ce dernier ARNm étant encore désigné ARNm sens (5' → 3').

Le terme d'ARN antisens s'adresse donc à une séquence d'ARN complémentaire de la séquence en bases de l'ARN messenger, le terme
25 complémentaire devant être compris en ce sens que chaque base (ou une majorité de bases) de la séquence antisens (lue dans le sens 3' → 5') est capable de s'apparier avec les bases correspondantes (G avec C, A avec U) de l'ARN messenger (séquence lue dans le sens 5' → 3').

La stratégie des ARN antisens, dans le cadre de la présente invention, est une approche moléculaire particulièrement adaptée à l'objectif d'une
30 modulation des taux de lignines des plantes. L'ARN antisens est un ARN produit par la transcription du brin d'ADN non codant (brin non-sens).

Cette stratégie antisens est plus particulièrement décrite dans le brevet européen n° 240 208.

35 On pense que l'inhibition de la synthèse d'une protéine selon la stratégie antisens, en l'occurrence de la CCR dans le cas présent, est la conséquence de la formation d'un duplex entre les deux ARN complémentaires (sens et antisens) empêchant ainsi la production de la protéine. Le mécanisme

- 12 -

cependant reste obscur. Le complexe ARN-ARN peut interférer soit avec une transcription ultérieure, soit avec la maturation, le transport ou la traduction ou bien encore conduire à une dégradation de l'ARNm.

Une combinaison de ces effets est également possible.

5 L'invention concerne également tout ARNm codé par une séquence d'ADN selon l'invention, et plus particulièrement:

- l'ARNm codé par la séquence d'ADN représentée par SEQ ID NO 1, ou codé par un fragment ou une séquence dérivée tels que définis ci-dessus, ledit ARNm étant susceptible de coder à son tour pour la CCR présente chez
10 l'eucalyptus, telle que représentée par SEQ ID NO 2, ou pour un fragment de cette CCR ou une protéine dérivée tels que définis ci-dessus, notamment pour la protéine représentée par SEQ ID NO 10,

- l'ARNm codé par la séquence d'ADN représentée par SEQ ID NO 3, ou codé par un fragment ou une séquence dérivée tels que définis ci-dessus,
15 ledit ARNm étant susceptible de coder à son tour pour la CCR présente chez le peuplier, telle que représentée par SEQ ID NO 4, ou pour un fragment de cette CCR ou une protéine dérivée tels que définis ci-dessus,

- l'ARNm codé par la séquence d'ADN représentée par SEQ ID NO 5, ou codé par un fragment ou une séquence dérivée tels que définis ci-dessus,
20 ledit ARNm étant susceptible de coder à son tour pour la CCR présente chez la fétuque, telle que représentée par SEQ ID NO 6, ou pour un fragment de cette CCR ou une protéine dérivée tels que définis ci-dessus,

- l'ARNm codé par la séquence d'ADN représentée par SEQ ID NO 7, ou codé par un fragment ou une séquence dérivée tels que définis ci-dessus,
25 ledit ARNm étant susceptible de coder à son tour pour la CCR présente chez le tabac, telle que représentée par SEQ ID NO 8, ou pour un fragment de cette CCR ou une protéine dérivée tels que définis ci-dessus.

L'invention a également pour objet tout ARNm antisens, tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend des nucléotides complémentaires
30 de la totalité ou d'une partie seulement des nucléotides constituant un ARNm tel que décrit ci-dessus selon l'invention, ledit ARNm antisens étant susceptible de s'hybrider (ou de s'apparier) avec ce dernier.

A ce titre, l'invention vise plus particulièrement les ARNm antisens codés par des séquences d'ADN selon l'invention, comprenant au moins une
35 région de 50 bases homologues à celles d'une région des séquences complémentaires des séquences d'ADN susmentionnées de l'invention.

Il n'y a pas de limite supérieure de taille pour les séquences d'ADN codant pour un ARN antisens selon l'invention; elles peuvent être aussi

- 13 -

longues que celles du messenger normalement produit dans les cellules, voire aussi longues que la séquence d'ADN génomique codant pour l'ARNm de la CCR.

5 Avantageusement, de telles séquences d'ADN codant pour un ARN antisens selon l'invention, comprennent entre environ 100 et environ 1000 paires de bases.

 L'invention a plus particulièrement pour objet toute séquence antisens comprenant un (ou plusieurs) ARNm antisens tel(s) que décrit(s) ci-dessus, ou fragment(s) de cet (ces) ARNm antisens, et une (ou plusieurs) séquence(s) 10 correspondant à un (ou plusieurs) domaine(s) catalytique(s) d'un ribozyme.

 A ce titre, l'invention vise plus particulièrement toute séquence antisens telle que décrite ci-dessus, comprenant le domaine catalytique d'un ribozyme flanqué de part et d'autre par des bras d'environ 8 bases complémentaires des séquences bordant un motif GUX (X représentant C, U ou A) comprises dans 15 l'un des ARNm de l'invention décrits ci-dessus (encore désignés ARN cibles) (Haseloff J., et Gerlach W. L., 1988, Nature, 334: 585-591).

 L'invention concerne également toute séquence d'ADN susceptible de coder pour une séquence antisens telle que décrite ci-dessus comprenant au moins un domaine catalytique d'un ribozyme lié à un ou plusieurs ARNm 20 antisens de l'invention, ou fragment(s) d'ARNm antisens (avantageusement des fragments d'environ 8 bases tels que décrits ci-dessus).

 L'invention a plus particulièrement pour objet encore toute séquence antisens comprenant

 L'invention a plus particulièrement pour objet:

25 - tout ARNm antisens, tel que décrit ci-dessus, caractérisé en ce qu'il est codé par la séquence nucléotidique complémentaire de celle représentée par SEQ ID NO 1, ledit ARNm antisens étant susceptible de s'hybrider avec l'ARNm codé par la séquence d'ADN représentée par SEQ ID NO 1,

 - tout ARNm antisens, tel que décrit ci-dessus, caractérisé en ce qu'il est 30 codé par la séquence nucléotidique complémentaire de celle représentée par SEQ ID NO 3, ledit ARNm antisens étant susceptible de s'hybrider avec l'ARNm codé par la séquence d'ADN représentée par SEQ ID NO 3,

 - tout ARNm antisens, tel que décrit ci-dessus, caractérisé en ce qu'il est 35 codé par la séquence nucléotidique complémentaire de celle représentée par SEQ ID NO 5, ledit ARNm antisens étant susceptible de s'hybrider avec l'ARNm codé par la séquence d'ADN représentée par SEQ ID NO 5,

 - tout ARNm antisens, tel que décrit ci-dessus, caractérisé en ce qu'il est codé par la séquence nucléotidique complémentaire de celle représentée par

- 14 -

SEQ ID NO 7, ledit ARNm antisens étant susceptible de s'hybrider avec l'ARNm codé par la séquence d'ADN représentée par SEQ ID NO 7,

5 - tout ARNm antisens, tel que décrit ci-dessus, caractérisé en ce qu'il est codé par la séquence nucléotidique complémentaire de celle représentée par SEQ ID NO 9, ledit ARNm antisens étant susceptible de s'hybrider avec l'ARNm codé par la séquence d'ADN représentée par SEQ ID NO 9.

10 L'invention concerne également les polypeptides recombinants codés par les séquences d'ADN de l'invention, lesdits polypeptides recombinants présentant une activité enzymatique équivalente à celle des CCR chez les plantes, et plus particulièrement les CCR recombinantes codées par les séquences représentées par SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 5 et SEQ ID NO 7, ou par des séquences dérivées de ces dernières selon l'invention, notamment par SEQ ID NO 9.

15 L'invention a plus particulièrement pour objet les polypeptides recombinants, et notamment les CCR recombinantes, tels qu'obtenus par transformation de cellules végétales en intégrant de façon stable dans leur génome, une séquence nucléotidique recombinante telle que définie ci-après, contenant une séquence d'ADN selon l'invention, notamment à l'aide d'un vecteur tel que décrit ci-après.

20 Par l'expression "polypeptides recombinants", on doit entendre toute molécule possédant une chaîne polypeptidique susceptible d'être produite par génie génétique, par l'intermédiaire d'une phase de transcription de l'ADN du gène correspondant, ce qui conduit à l'obtention d'ARN qui est par la suite transformé en ARNm (par suppression des introns), ce dernier étant ensuite
25 traduit par les ribosomes, sous forme de protéines, le tout étant effectué sous contrôle d'éléments de régulation appropriés à l'intérieur d'une cellule hôte. Par conséquent, l'expression "polypeptides recombinants" utilisée n'exclut pas la possibilité que lesdits polypeptides comprennent d'autres groupements, tels que les groupements glycosylés.

30 Bien entendu, le terme "recombinant" indique que le polypeptide a été produit par génie génétique, car il résulte de l'expression, dans un hôte cellulaire approprié, de la séquence nucléotidique correspondante qui a été auparavant introduite dans un vecteur d'expression utilisé pour transformer ledit hôte cellulaire. Toutefois, ce terme "recombinant" n'exclut pas
35 la possibilité que le polypeptide soit produit par un procédé différent, par exemple par synthèse chimique classique selon les méthodes connues utilisées pour la synthèse de protéines, ou par clivage protéolytique de molécules de plus grande taille.

- 15 -

L'invention concerne plus particulièrement la CCR telle que présente dans les cellules d'eucalyptus et représentée par SEQ ID NO 2, la CCR telle que présente dans les cellules de peuplier et représentée par SEQ ID NO 4, la CCR telle que présente dans les cellules de fétuque élevée et représentée par SEQ ID NO 6, ou la CCR telle que présente dans les cellules de tabac et représentée par SEQ ID NO 8, ou toute protéine dérivée de ces dernières, notamment par addition, et/ou suppression, et/ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés, notamment la protéine dérivée de la CCR d'eucalyptus et représentée par SEQ ID NO 10, ou tout fragment issu desdites CCR ou de leurs séquences dérivées, lesdits fragments et séquences dérivées étant susceptibles de posséder une activité enzymatique équivalente à celle des CCR susmentionnées.

L'invention a également pour objet les séquences nucléotidiques codant pour la CCR représentée par SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 8, ou SEQ ID NO 10, ou toute séquence dérivée ou fragment de ces dernières, tels que définis ci-dessus, lesdites séquences nucléotidiques étant caractérisées en ce qu'elles correspondent à tout ou partie des séquences représentées par SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 7, ou SEQ ID NO 9 respectivement, ou à toute séquence dérivée de ces dernières par dégénérescence du code génétique, et étant néanmoins susceptibles de coder pour les CCR ou séquence dérivée ou fragment de ces dernières, tels que définis ci-dessus.

L'invention vise également les complexes formés entre les ARNm antisens, tels que décrits ci-dessus, et les ARNm selon l'invention, susceptibles de coder pour tout ou partie d'une CCR chez les plantes.

L'invention a plus particulièrement pour objet le complexe formé entre l'ARNm codé par la séquence SEQ ID NO 1 et l'ARNm antisens codé par la séquence complémentaire de la séquence SEQ ID NO 1, l'ARNm codé par la séquence SEQ ID NO 3 et l'ARNm antisens codé par la séquence complémentaire de la séquence SEQ ID NO 3, l'ARNm codé par la séquence SEQ ID NO 5 et l'ARNm antisens codé par la séquence complémentaire de la séquence SEQ ID NO 5, l'ARNm codé par la séquence SEQ ID NO 7 et l'ARNm antisens codé par la séquence complémentaire de la séquence SEQ ID NO 7, l'ARNm codé par la séquence SEQ ID NO 9 et l'ARNm antisens codé par la séquence complémentaire de SEQ ID NO 9.

- 16 -

L'invention a également pour objet toute séquence nucléotidique recombinante contenant une (ou plusieurs) région(s) codante(s), cette (ces) région(s) codante(s) étant constituée(s):

5 - d'une séquence nucléotidique codant pour un ARNm, cet ARNm codant lui-même pour une CCR chez les plantes, ou d'un fragment de la séquence nucléotidique susmentionnée, ce fragment codant pour un ARNm, cet ARNm codant lui-même pour un fragment d'une CCR chez les plantes, ce fragment de CCR présentant une activité enzymatique équivalente à celle de la CCR susmentionnée, ou d'une séquence nucléotidique dérivée de la séquence
10 nucléotidique susmentionnée, ou dérivée du fragment susmentionné, notamment par mutation et/ou addition, et/ou suppression, et/ou substitution d'un ou plusieurs nucléotides, cette séquence dérivée codant pour un ARNm, cet ARNm codant lui-même pour une protéine dérivée présentant une activité enzymatique équivalente à celle de la CCR susmentionnée, ou

15 - d'une séquence nucléotidique complémentaire de tout ou partie de la séquence nucléotidique codant pour un ARNm, ou du fragment de cette séquence, ou de la séquence dérivée de ces derniers, tels que définis ci-dessus, cette séquence complémentaire codant pour un ARNm antisens susceptible de s'hybrider avec l'un des ARNm susmentionnés.

20 L'invention a plus particulièrement pour objet toute séquence nucléotidique recombinante (ou ADN recombinant), caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une séquence d'ADN selon l'invention, choisie parmi celles décrites ci-dessus, ladite séquence d'ADN étant insérée dans une séquence hétérologue.

25 L'invention concerne plus particulièrement toute séquence nucléotidique recombinante telle que décrite ci-dessus, comprenant, à titre de région codante, la séquence nucléotidique représentée par SEQ ID NO 1, ou par SEQ ID NO 3, ou par SEQ ID NO 5, ou par SEQ ID NO 7, ou tout fragment ou une séquence nucléotidique dérivée de ces dernières, tels que définis ci-
30 dessus, lesdites séquences nucléotidiques ou ledit fragment étant insérés dans une séquence hétérologue, et étant susceptibles de coder pour la CCR représentée par SEQ ID NO 2, ou par SEQ ID NO 4, ou par SEQ ID NO 6, ou par SEQ ID NO 8 respectivement, ou pour un fragment de ces CCR, ou pour une protéine dérivée de ces dernières, tels que définis ci-dessus.

35 L'invention concerne plus particulièrement encore, toute séquence nucléotidique recombinante comprenant, à titre de région codante, une séquence nucléotidique complémentaire de celle représentée par SEQ ID NO 1, ou par SEQ ID NO 3, ou par SEQ ID NO 5, ou par

- 17 -

SEQ ID NO 7, ou tout fragment ou toute séquence nucléotidique dérivée de cette séquence complémentaire, tels que définis ci-dessus, lesdites séquences complémentaires ou ledit fragment étant insérés dans une séquence hétérologue, et étant susceptibles de coder pour un ARNm antisens capable de
5 s'hybrider avec tout ou partie de l'ARNm codant pour une CCR chez les plantes, et plus particulièrement avec tout ou partie de l'ARNm codant pour la CCR représentée par SEQ ID NO 2, ou par SEQ ID NO 4, ou par SEQ ID NO 6, ou par SEQ ID NO 8 respectivement.

Les ADN recombinants selon l'invention sont davantage caractérisés en
10 ce qu'ils comprennent les éléments nécessaires pour réguler l'expression de la séquence nucléotidique codant pour une CCR, ou de sa séquence complémentaire codant pour un ARNm antisens selon l'invention, notamment un promoteur et un terminateur de la transcription de ces séquences.

Parmi les différents promoteurs susceptibles d'être utilisés dans les
15 constructions d'ADN recombinants selon l'invention, on peut citer:

- le promoteur endogène contrôlant l'expression de la CCR chez une plante, notamment le promoteur situé en amont de la séquence représentée par SEQ ID NO 1 chez l'eucalyptus, ou
- des promoteurs de type constitutif à forte expression, exemples:
20 35S CAMV (décrit dans Benfey et al. (1990), EMBO J., 9 (6), 1677-1684), EF1 α (promoteur du gène d'un facteur d'élongation dans la synthèse protéique décrit par Curie et al. (1991), Nucl. Acids Res., 19, 1305-1310),
- des promoteurs de type spécifique à expression particulière dans des tissus individuels, exemples: promoteur CAD (décrit par Feuillet C. (1993),
25 Thèse de l'Université de Toulouse III), promoteur GRP 1-8 (décrit par Keller et Baumgartner, (1991), Plant Cell., 3, 1051-1061) à expression dans des tissus vasculaires spécifiques.

L'invention concerne également toute séquence nucléotidique recombinante telle que décrite ci-dessus, et comprenant également à titre de
30 région codante au moins une séquence nucléotidique codant pour tout ou partie d'un ARNm codant lui-même pour une autre enzyme que la CCR, qui se trouve être impliquée dans une étape de la biosynthèse des lignines chez les plantes, notamment l'ARNm codant pour l'alcool cinnamylique deshydrogénase (CAD), ou comprenant également à titre de région codante au
35 moins une séquence nucléotidique codant pour tout ou partie d'un ARNm antisens susceptible de s'hybrider avec l'ARNm susmentionné, notamment avec l'ARNm codant pour la CAD.

- 18 -

Les séquences nucléotidiques recombinantes susmentionnées de l'invention sont avantageusement obtenues à partir de vecteurs dans lesquels sont insérées les séquences d'ADN codant pour une enzyme nécessaire à la biosynthèse des lignines chez les plantes.

5 A ce titre, l'invention a plus particulièrement pour objet le vecteur dénommé pEUCCR, comprenant la séquence représentée par SEQ ID NO 1 clonée dans le vecteur Bluescript, et déposé en culture dans des cellules de *E. coli* DH5 α à la Collection Nationale de Culture de Micro-organismes (CNCM) de l'Institut Pasteur à Paris (France), le 17 mars 1994 sous le
10 n° I-1405.

Les vecteurs susmentionnés sont digérés à l'aide d'enzymes de restriction appropriées afin de récupérer lesdites séquences d'ADN qui s'y trouvent insérées.

Ces dernières sont ensuite insérées en aval d'un promoteur approprié, et
15 en amont d'un terminateur approprié de l'expression, au sein des ADN recombinants selon l'invention.

L'invention vise plus particulièrement les ADN recombinants comprenant la séquence représentée par SEQ ID NO 1, codant pour l'ARNm codant lui-même pour la CCR représentée par SEQ ID NO 2, tels qu'obtenus
20 par digestion du vecteur pEUCCR susmentionné, récupération de la séquence d'ADN de l'invention et insertion de cette dernière dans le sens 5' \rightarrow 3', au sein d'une séquence d'ADN hétérologue comprenant un promoteur et un terminateur de l'expression de ladite séquence.

L'invention a également plus particulièrement pour objet les ADN
25 recombinants comprenant la séquence complémentaire de la séquence SEQ ID NO 1, codant pour un ARNm antisens capable de s'hybrider avec l'ARNm codant pour la CCR représentée par SEQ ID NO 2, tels qu'obtenus par digestion du vecteur pEUCCR susmentionné, récupération de la séquence d'ADN de l'invention, et insertion de cette dernière en sens inverse, c'est-à-
30 dire dans le sens 3' \rightarrow 5', au sein d'une séquence d'ADN hétérologue comprenant un promoteur et un terminateur de l'expression de la séquence complémentaire.

A titre d'exemple de terminateur utilisable dans de telles constructions, on peut citer l'extrémité 3' du gène de la nopaline synthase d'*Agrobacterium tumefaciens*.
35

Ainsi, d'une manière générale, les séquences nucléotidiques recombinantes selon l'invention, contenant une séquence d'ADN codant pour une CCR (ou fragment de CCR ou protéine dérivée), et/ou d'autres enzymes

nécessaires à la biosynthèse des lignines, sont obtenues par récupération de ladite séquence d'ADN à partir des vecteurs susmentionnés, et insertion de cette séquence dans la séquence hétérologue, tandis que les séquences nucléotidiques recombinantes contenant une séquence d'ADN codant pour un
5 ARNm antisens selon l'invention, sont obtenus par récupération de la séquence d'ADN susmentionnée et insertion en sens inverse de cette dernière dans ladite séquence hétérologue.

A titre d'illustration, on peut utiliser tout ou partie de l'ADN complémentaire (ADNc) représenté par SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 3,
10 SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 7 ou SEQ ID NO 9, pour la construction des ADN recombinants susmentionnés, ou bien tout ou partie du clone génomique correspondant à une CCR (qui correspond aux ADNc susmentionnés + d'éventuels introns). Ce clone génomique peut être obtenu en utilisant les ADNc comme sondes pour cribler une banque génomique, cette dernière étant
15 elle-même obtenue suivant la méthode décrite par Sambrook, Fritsch et Maniatis, Molecular Cloning Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989.

L'invention a également pour objet tout vecteur recombinant, utilisable pour la transformation de plantes, caractérisé en ce qu'il comprend une
20 séquence nucléotidique recombinante choisie parmi celles décrites ci-dessus, selon l'invention, intégrée dans l'un des sites de son génome non essentiels pour sa réplication.

Parmi les vecteurs recombinants susmentionnés utilisables pour la transformation de plantes, on peut citer: les vecteurs binaires dérivés de pBIN
25 19 (Bevan et al., (1984), Nucl. Acids Res., 12 (22), 8711-8721).

Des exemples de construction de vecteurs recombinants selon l'invention sont décrits dans la description détaillée qui suit de l'invention.

La présente invention a également pour objet un procédé de régulation de la biosynthèse des lignines chez les plantes, soit par diminution, soit par
30 augmentation des quantités de lignines produites, par rapport aux quantités normales de lignines produites chez ces plantes, ledit procédé comprenant une étape de transformation de cellules de ces plantes à l'aide d'un vecteur contenant:

- une séquence nucléotidique codant pour un ARNm, cet ARNm codant
35 lui-même pour une CCR chez les plantes, ou d'un fragment de la séquence nucléotidique susmentionnée, ce fragment codant pour un ARNm, cet ARNm codant lui-même pour un fragment d'une CCR chez les plantes, ce fragment de CCR présentant une activité enzymatique équivalente à celle de la CCR

- 20 -

susmentionnée, ou d'une séquence nucléotidique dérivée de la séquence nucléotidique susmentionnée, ou dérivée du fragment susmentionné, notamment par mutation et/ou addition, et/ou suppression, et/ou substitution d'un ou plusieurs nucléotides, cette séquence dérivée codant pour un ARNm, cet ARNm codant lui-même pour une protéine dérivée présentant une activité enzymatique équivalente à celle de la CCR susmentionnée, ou

- une séquence nucléotidique complémentaire de tout ou partie de la séquence nucléotidique codant pour un ARNm, ou du fragment de cette séquence, ou de la séquence dérivée de ces derniers, tels que définis ci-dessus, cette séquence complémentaire codant pour un ARNm antisens susceptible de s'hybrider avec l'un des ARNm susmentionnés,

ladite transformation étant effectuée notamment à l'aide d'un vecteur tel que décrit ci-dessus.

L'invention a plus particulièrement pour objet un procédé de diminution de la quantité de lignines produites par biosynthèse chez les plantes, ce procédé étant effectué par transformation du génome de ces plantes, en y incorporant:

- au moins une séquence d'ADN selon l'invention telle que décrite ci-dessus, codant pour un ARNm antisens susceptible de s'hybrider avec tout ou partie de l'ARNm codant pour la CCR représentée par SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 6 ou SEQ ID NO 8, ou pour une protéine dérivée de ces dernières telle que définie ci-dessus, notamment pour la protéine représentée par SEQ ID NO 10,

- et, le cas échéant, au moins une séquence d'ADN codant pour un ARNm antisens capable de s'hybrider à un ARNm codant pour une autre enzyme que la CCR, qui se trouve être impliquée dans une étape de la biosynthèse des lignines chez les plantes, notamment l'ARNm codant pour la CAD,

ladite transformation étant réalisée:

- soit à l'aide d'un vecteur recombinant tel que décrit ci-dessus, contenant une séquence d'ADN codant pour un ARNm antisens capable de s'hybrider avec l'ARNm codant pour la CCR ou pour une protéine dérivée, telle que définie ci-dessus, et, le cas échéant, contenant une ou plusieurs séquence(s) d'ADN codant pour un ARNm antisens capable de s'hybrider à un ARNm codant pour une autre enzyme que la CCR telle que définie ci-dessus,

- soit à l'aide de plusieurs vecteurs recombinants dont l'un au moins contient une séquence d'ADN codant pour un ARNm antisens capable de s'hybrider avec l'ARNm codant pour la CCR ou pour une protéine dérivée,

- 21 -

telle que définie ci-dessus, tandis que l' (ou les) autre(s) vecteur(s) recombinant(s) contien(nen)t une séquence d'ADN codant pour un ARNm antisens capable de s'hybrider à un ARNm codant pour une autre enzyme que la CCR, telle que définie ci-dessus.

5 Un autre procédé de diminution de la quantité de lignines produites par biosynthèse chez les plantes, est celui réalisé par transformation du génome de ces plantes, en y incorporant:

- au moins une séquence d'ADN selon l'invention représentée par SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 5 ou SEQ ID NO 7, ou un
10 fragment ou une séquence dérivée de cette dernière, tels que définis ci-dessus, notamment la séquence représentée par SEQ ID NO 9,

- et, le cas échéant, au moins une séquence d'ADN codant pour tout ou partie d'une autre enzyme que la CCR, qui se trouve être impliquée dans une étape de la biosynthèse des lignines chez les plantes, notamment une séquence
15 d'ADN codant pour tout ou partie de la CAD, ladite transformation étant réalisée:

- soit à l'aide d'un vecteur recombinant tel que décrit ci-dessus, contenant la séquence d'ADN selon l'invention susmentionnée, ou un fragment ou une séquence dérivée de cette dernière, tels que définis ci-dessus, et, le cas
20 échéant, contenant une ou plusieurs séquence(s) d'ADN codant pour tout ou partie d'une enzyme autre que la CCR, telle que définie ci-dessus,

- soit à l'aide de plusieurs vecteurs recombinants dont l'un au moins contient une séquence d'ADN selon l'invention susmentionnée, ou un fragment ou une séquence dérivée de cette dernière, tels que définis ci-dessus,
25 tandis que l' (ou les) autre(s) vecteur(s) recombinant(s) contien(nen)t une séquence d'ADN codant pour tout ou partie d'une enzyme autre que la CCR, telle que définie ci-dessus.

Cette dernière méthode fait appel au mécanisme de co-suppression. La co-suppression a été observée quand des copies du gène endogène ont été
30 introduites dans le génome. Bien que le mécanisme de la co-suppression soit actuellement inconnu, une des hypothèses les plus fréquemment retenue est que la régulation négative de l'expression du gène viendrait de la production d'une faible proportion d'ARN antisens dérivée d'un transgène à travers une lecture du "mauvais" brin du transgène (Grierson et al., Trends Biotech., 9:
35 122-123).

L'invention a également pour objet un procédé de diminution de la quantité de lignines produites par biosynthèse chez les plantes, ce procédé étant réalisé par transformation du génome de ces plantes en y incorporant une

- 22 -

séquence d'ADN telle que décrite ci-dessus selon l'invention, codant pour une séquence antisens comprenant un (ou plusieurs) domaine(s) catalytique(s) d'un ribozyme lié(s) à un (ou plusieurs) ARNm antisens, ou fragment(s) d'ARNm antisens de l'invention, ladite transformation étant réalisée à l'aide d'un vecteur recombinant comprenant une séquence nucléotidique recombinante selon l'invention contenant elle-même la séquence d'ADN susmentionnée.

Il est important de noter que les méthodes susmentionnées permettent d'aboutir à des plantes transformées présentant des niveaux différents de réduction de l'activité CCR (selon le niveau d'insertion de la séquence d'ADN codant pour l'ARNm antisens, le nombre de copies de cette séquence d'ADN intégrée dans le génome...), et donc des teneurs en lignines.

Le choix des transformants permettra donc une modulation contrôlée des teneurs en lignines compatible avec un développement normal de la plante.

D'une manière générale, si l'on considère que la teneur moyenne normale en lignines d'une plante varie entre environ 15% et environ 35% en poids de matière sèche, la réduction de la teneur en lignines résultant de la mise en oeuvre d'un des procédés susmentionnés, est avantageusement telle que les plantes ainsi transformées présentent une teneur moyenne en lignines variant entre environ 10% et environ 30%, ou encore entre environ 12% et environ 32%.

A titre d'illustration, la teneur en lignines d'une plante peut être mesurée selon une variante de la méthode de Johnson et al., (1961), T.A.P.P.I., 44, 793-798, qui est décrite en détail dans Alibert et Boudet (1979), Physiol., Veg., 17 (1), 67-74, et dont les principales étapes sont les suivantes: après obtention d'une poudre alcool benzène contenant les lignines du matériel végétal, les lignines sont solubilisées par le bromure d'acétyle et dosées en fonction de leur absorption dans l'ultraviolet.

L'invention vise plus particulièrement l'application des procédés susmentionnés de diminution des teneurs en lignines dans les plantes, à l'obtention de plantes fourragères transformées génétiquement, présentant des teneurs en lignines réduites par rapport aux teneurs normales en lignines chez ces plantes, et dont la digestibilité se trouve être ainsi améliorée par rapport à ces mêmes plantes non transformées.

Parmi les principales plantes fourragères susceptibles d'être transformées dans le cadre de la présente invention, on peut citer: la luzerne, la fétuque, le maïs destiné à l'ensilage, etc...

L'invention concerne également l'application des procédés susmentionnés de diminution des teneurs en lignines chez les plantes, à

- 23 -

l'obtention de plantes, et plus particulièrement d'arbres, transformés génétiquement, présentant des teneurs en lignines réduites par rapport aux teneurs normales en lignines chez ces plantes, ces plantes ou arbres étant particulièrement avantageux à utiliser dans le cadre de la production de la pâte à papier.

Un troisième domaine potentiel d'application des procédés susmentionnés de régulation négative de l'expression du gène de la CCR, concerne la stimulation de la croissance des plantes transformées. Divers arguments soulignent (Sauter et Kende, 1992, Plant and Cell Physiology, 33 (8):1089), qu'une lignification précoce et rapide est un frein au grandissement cellulaire et donc à la croissance des végétaux. Ainsi la mise en oeuvre des procédés susmentionnés est susceptible de permettre pour les plantes ainsi transformées à lignification réduite une meilleure croissance et donc de meilleurs rendements.

L'invention concerne également un procédé d'augmentation de la quantité de lignines produites par biosynthèse chez les plantes, ce procédé étant effectué par transformation du génome de ces plantes, en y incorporant:

- au moins une séquence d'ADN selon l'invention représentée par SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 5 ou SEQ ID NO 7, ou un fragment ou une séquence dérivée de cette dernière, tels que définis ci-dessus, notamment la séquence représentée par SEQ ID NO 9,

- et, le cas échéant, au moins une séquence d'ADN codant pour tout ou partie d'une autre enzyme que la CCR, qui se trouve être impliquée dans une étape de la biosynthèse des lignines chez les plantes, notamment une séquence d'ADN codant pour tout ou partie de la CAD, ladite transformation étant réalisée:

- soit à l'aide d'un vecteur recombinant tel que décrit ci-dessus, contenant la séquence d'ADN selon l'invention susmentionnée, ou un fragment ou une séquence dérivée de cette dernière, tels que définis ci-dessus, et, le cas échéant, contenant une ou plusieurs séquence(s) d'ADN codant pour tout ou partie d'une enzyme autre que la CCR, telle que définie ci-dessus,

- soit à l'aide de plusieurs vecteurs recombinants dont l'un au moins contient une séquence d'ADN selon l'invention susmentionnée, ou un fragment ou une séquence dérivée de cette dernière, tels que définis ci-dessus, tandis que l' (ou les) autre(s) vecteur(s) recombinant(s) contien(nen)t une séquence d'ADN codant pour tout ou partie d'une enzyme autre que la CCR, telle que définie ci-dessus.

D'une manière générale, toujours si l'on considère que la teneur moyenne normale en lignines d'une plante varie entre environ 15% et environ 35% en poids de matière sèche, l'augmentation de la teneur en lignines résultant de la mise en oeuvre du procédé susmentionné, est avantageusement telle que les plantes ainsi transformées présentent une teneur moyenne en lignines variant entre environ 20% et environ 40%, entre environ 18% et environ 38%.

L'invention vise plus particulièrement l'application du procédé susmentionné d'augmentation des teneurs en lignines dans les plantes (encore désigné procédé de surexpression du gène de la CCR), à l'obtention de plantes transformées génétiquement, présentant des teneurs en lignines augmentées par rapport aux teneurs normales en lignines chez ces plantes, et dont les propriétés de résistance à des attaques de l'environnement, notamment à des attaques parasitaires, se trouvent être ainsi améliorées par rapport à ces mêmes plantes non transformées. Il est particulièrement avantageux dans ce dernier cas, d'utiliser en association avec le gène CCR, ou une séquence dérivée, dans les vecteurs susmentionnés, des promoteurs spécifiques particulièrement exprimés dans les tissus de surface et/ou en réponse à la blessure.

Par ailleurs, l'invention concerne également l'application du procédé susmentionné de surexpression du gène de la CCR, à l'amélioration de la croissance des plantes ainsi transformées génétiquement, notamment dans certains domaines tels que l'horticulture ou l'arboriculture, où il est souhaitable d'obtenir des plantes de dimension réduite.

Enfin, les cycles benzéniques de la lignine ont une plus grande énergie intrinsèque que les chaînes aliphatiques des résidus glucose de la cellulose. Ainsi, l'augmentation de la proportion de lignines chez les végétaux utilisés comme combustibles, selon le procédé susmentionné de l'invention, permet d'améliorer le potentiel énergétique de ces végétaux combustibles ainsi transformés.

Dans les deux cas de régulation négative ou de surexpression de la CCR, il est tout à fait envisageable que la modulation de cette activité se répercute sur la teneur en lignines des plantes transformées. En effet, la CCR dont le niveau d'activité est très bas dans la plante, semble constituer l'enzyme régulatrice de la synthèse des lignines.

S'agissant des techniques de transformation utilisées pour la mise en oeuvre d'un des procédés décrits ci-dessus de l'invention, on aura avantageusement recours aux techniques suivantes:

- 25 -

A) La technologie de transformation par l'intermédiaire du plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* décrite par Bevan (1984) Nucleic Acid Research, 12: 8711-8721. Elle fait appel essentiellement à la méthode de co-culture, et fait intervenir une co-transformation avec un gène de sélection pour pouvoir repérer les transformants.

Elle est particulièrement applicable aux dicotylédones, ex.: tabac, luzerne, colza.

B) La technique de transfert direct de gènes par biolistique décrite en détail par (Zumbrum et al., 1989, Technique 1, 204-216; Sanford et al., 1991, Technique 3, 3-16).

Cette technique implique l'association de l'ADN recombinant selon l'invention à des microparticules d'or ou de tungstène qui sont propulsées à l'aide d'un canon à particules sur le tissu à transformer. Elle sera particulièrement appliquée à la transformation d'espèces réfractaires aux agrobactéries.

Dans les deux cas susmentionnés, la vérification de la présence de l'ADN recombinant selon l'invention sera réalisée par des expériences d'hybridation de type southern et d'amplification génique (polymerase chain reaction), à l'aide de sondes et d'amorces oligonucléotidiques issues notamment de la séquence SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 7 ou SEQ ID NO 9.

L'invention concerne également les cellules de plantes transformées par un vecteur selon l'invention, notamment par les techniques décrites ci-dessus, et comprenant une séquence d'ADN selon l'invention intégrée de façon stable dans leur génome.

L'invention vise également les plantes transformées telles qu'obtenues par culture des cellules transformées susmentionnées.

Les plantes transformées peuvent être ensuite propagées par voie sexuelle ou par voie végétative *in vitro* ou *in natura*.

L'invention a également pour objet les fragments de plantes, notamment fruits, semences, pollen, transformés par incorporation dans leur génome d'une séquence d'ADN selon l'invention, à l'aide des vecteurs recombinants susmentionnés.

L'invention concerne également les anticorps dirigés contre les polypeptides recombinants de l'invention, et plus particulièrement ceux dirigés contre les CCR recombinantes susmentionnées.

De tels anticorps peuvent être obtenus par immunisation d'un animal avec ces polypeptides suivie de la récupération des anticorps formés.

- 26 -

Il va de soi que cette production n'est pas limitée aux anticorps polyclonaux.

Elle s'applique encore à tout anticorps monoclonal produit par tout hybridome susceptible d'être formé, par des méthodes classiques, à partir des
5 cellules spléniques d'un animal, notamment de souris ou de rat, immunisés contre l'un des polypeptides purifiés de l'invention d'une part, et des cellules d'un myélome approprié d'autre part, et d'être sélectionné, par sa capacité à produire des anticorps monoclonaux reconnaissant le polypeptide susmentionné initialement mis en oeuvre pour l'immunisation des animaux.

10 L'invention vise également l'utilisation des anticorps susmentionnés dirigés contre les polypeptides recombinants de l'invention, pour la mise en oeuvre d'une méthode de détection ou de dosage des CCR chez les plantes, à partir d'échantillons prélevés chez ces dernières.

L'invention sera davantage détaillée dans la description qui suit de
15 l'obtention de la CCR sous forme purifiée chez l'eucalyptus, et de l'ADNc codant pour la CCR d'eucalyptus, de peuplier, de la fétuque élevée et du tabac

A) Obtention de la CCR d'eucalyptus purifiée, et de l'ADNc codant pour une CCR d'eucalyptus.

20

I Purification de la CCR d'eucalyptus.

La CCR a fait l'objet d'un nombre très restreint d'études. Parmi les quelques publications la concernant, on peut citer:

25 Wengenmayer H., Ebel J., Grisebach H., 1976 - Enzymatic synthesis of lignin precursors, purification and properties of a cinnamoyl CoA: NaDPH reductase from cell suspension cultures from soybean (*Glycine max*), Eur. J. Biochem., 65: 529-536.

30 Luderitz T., Grisebach H., 1981 - Enzymatic synthesis of lignin precursors, comparison of cinnamoyl: CoA reductase and cinnamyl alcohol dehydrogenase: NADP dehydrogenase from spruce (*Picea abies* L.) and soybean (*Glycine max* L.), Eur. J. Biochem., 119: 115-127.

35 Sarni F., Grand C., Boudet A.M., 1984 - Purification and properties of cinnamoyl: CoA reductase and cinnamyl alcohol dehydrogenase from poplar stems (*Populus x euramericana*). Eur. J. Biochem., 139: 259-265.

Le travail décrit ci-après a contribué à définir un protocole de purification original, simple et rapide de la CCR d'eucalyptus. Ce protocole est également plus efficace que ceux décrits précédemment dans la littérature.

- 27 -

En effet, il a permis pour la première fois, l'obtention de quantités d'enzyme purifiée à homogénéité, suffisantes pour obtenir des séquences peptidiques internes et conduire à terme au clonage de l'ADNc correspondant.

Toutes les étapes de purification de la CCR ont été réalisées à 4°C.

5

1. Obtention d'un extrait brut de xylème d'eucalyptus.

Le matériel végétal a été obtenu par "grattage" d'une fraction tissulaire enrichie en xylème de branches d'*Eucalyptus gunnii* âgés de 5 ans.

10 300 g de xylème préalablement congelé dans l'azote liquide ont été réduits en poudre à l'aide d'un moulin à café. Le broyat ainsi obtenu a été homogénéisé dans un litre de tampon d'extraction (100 mM Tris-HCl pH 7.6, 2% PEG 6000, 5 mM DTT, 2% PVPP), filtré sur deux épaisseurs de Miracloth, et amené à 30% de la saturation en sulfate d'ammonium. Après une
15 centrifugation de 30 minutes à 15000xg, le culot obtenu est remis en suspension dans 60 ml de tampon 1 [20 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM DTT (dithiothreitol), 5% éthylène glycol]. L'extrait ainsi obtenu est "clarifié" par une centrifugation de 15 min à 10 000xg, puis dessalé par passage sur une Sephadex G25 équilibrée dans le tampon 1.

20

2. Chromatographie d'affinité sur Red Sepharose.

L'extrait brut dessalé est déposé sur une colonne d'affinité "Red Sepharose" (1.5 x 19 cm, Pharmacia), équilibrée dans le tampon 1. Après un
25 premier rinçage de la colonne par 50 ml de tampon 1, les protéines sont éluées par un gradient linéaire de Tris de 20 mM à 1.5 M Tris-HCl pH7.5, contenant 5 mM DTT, 5% éthylène glycol. Le volume total du gradient est de 200 ml et le débit de 36 ml/h. les fractions présentant une activité CCR sont regroupées et dessalées par passage sur une colonne de Séphadex G25, équilibrée dans le
30 tampon 1.

3. Chromatographie d'échange d'anions sur MonoQ.

Les fractions ainsi regroupées et dessalées sont chromatographiées sur
35 une colonne d'échange d'anions MonoQ (HR 5/5, Pharmacia). L'élution des protéines est effectuée par l'application d'un gradient linéaire de 20 à 300 mM en Tris-HCl pH 7.5, contenant 5% d'éthylène glycol et 5 mM DTT. Le volume total du gradient est de 50 ml et le débit de 1 ml/min. Comme à

- 28 -

l'étape précédente, les fractions contenant l'enzyme CCR active sont regroupées et dessalées, mais dans ce cas le tampon d'équilibration des colonnes de Sephadex G25 est un tampon phosphate 20 mM pH 7.6, contenant 5 mM DTT (tampon 2).

5

4. Chromatographie d'affinité sur "Mimetic Red".

Le groupe de fractions CCR ainsi obtenu est déposé sur une colonne Mimetic Red 2 A6XL (ACL, Cambridge). La colonne est préalablement lavée avec 30 ml de tampon 2 contenant 8 mM NAD. Ce lavage a pour but d'éliminer des enzymes fonctionnant spécifiquement avec le NAD comme cofacteur, telle que la malate deshydrogénase qui copurifie avec la CCR dans les étapes précédentes. L'élution spécifique de la CCR est obtenue par application d'un gradient (15 ml) de NADP 0-8 mM dans le tampon 2. Les fractions contenant la CCR pure et active sont conservées à -80°C après addition d'un stabilisateur (éthylène glycol à la concentration finale de 5%).

L'enzyme purifiée ainsi obtenue présente une activité spécifique de 451 nKat/mg de protéine, en utilisant le feruloyl CoA comme substrat. Le rendement obtenu (36 µg de protéine pure pour 300 g de matériel végétal de départ) ne reflète pas la proportion de CCR *in planta*, en effet dans un souci majeur d'éliminer le maximum de contaminants à chaque étape de purification, seules les fractions présentant une très forte activité CCR sont traitées par l'étape suivante. Le facteur de purification obtenu par ce protocole est de 282.

25

II Caractérisation de la CCR.

La CCR d'eucalyptus est un monomère de 38kD comme en témoignent les résultats convergents obtenus pour la taille de l'enzyme native par chromatographie d'exclusion sur Superose 6 (Pharmacia), et pour la taille de la sous-unité monomère sur gel d'électrophorèse dénaturant. Le point isoélectrique, estimé par chromatographie sur MonoP (Pharmacia) est proche de 7.

La recherche du pH et du tampon optimum fait ressortir que la mesure de l'activité CCR telle qu'elle a été initialement décrite (Luderitz et Grisebach, 1981), est parfaitement adaptée à la mesure de l'activité CCR d'eucalyptus (tampon phosphate 100 mM, pH 6.25).

La pureté de la CCR, présente à l'état d'une bande unique sur gel d'électrophorèse monodimensionnelle (SDS PAGE) a été confirmée par

- 29 -

l'obtention d'une seule tache ("spot") après électrophorèse bidimensionnelle et coloration à l'argent.

III Obtention de l'ADNc codant pour la CCR d'eucalyptus

5 Afin de s'affranchir d'un éventuel problème de contamination résiduelle non détectable, l'enzyme pure a été soumise à une électrophorèse préparative en conditions semi-dénaturantes et digérée *in situ* dans le gel. La digestion a été réalisée à l'aide d'endolysine C qui coupe spécifiquement les protéines
10 après les résidus lysine, permettant l'obtention de peptides relativement longs. Les peptides résultant de la digestion ont été séparés en phase reverse sur HPLC et certains d'entre eux ont été séquencés à l'aide d'un microséquenceur de protéines (Applied Biosystems 470). Les séquences de ces peptides internes figurent ci-dessous:

- | | | |
|----|------------|---|
| 15 | peptide 8 | (a) Asn-Trp-Tyr-Cys-Tyr-Gly-Lys |
| | | (b) His-Leu-Pro-Val-Pro-X-Pro-Pro-Glu-Asp-Ser-Val-Arg |
| | | X représentant tout acide aminé |
| | peptide 10 | Thr-Tyr-Ala-Asn-Ser-Val-Gln-Ala-Tyr-Val-His-Val-Lys |
| 20 | peptide 13 | Gly-Cys-Asp-Gly-Val-Val-His-Thr-Ala-Ser-Pro-Val-Thr-Asp-Asp |
| | peptide 17 | Leu-Arg-Asp-Leu-Gly-Leu-Glu-Phe-Thr-Pro-Val-Lys |
| 25 | peptide 18 | Gly-Asp-Leu-Met-Asp-Tyr-Gly-Ser-Leu-Glu-Glu-Ala-Ile-Lys |

L'ADNc codant pour la CCR a été obtenu par criblage à l'aide d'oligonucléotides d'une banque d'ADNc construite dans le phage λ ZAPII (vecteur commercialement disponible, Stratagène) à partir de messagers extraits de xylème d'*Eucalyptus gunnii*. 600 000 phages ont été criblés à l'aide
30 d'un groupe d'oligonucléotides dégénérés marqués à l'extrémité 3' au phosphore 32, à l'aide d'une terminal transferase. Les séquences des oligonucléotides utilisés pour le criblage ont été déterminées à partir des séquences peptidiques internes susmentionnées. Ces peptides ayant été générés par coupure à l'endolysine C, une lysine a été rajoutée en première position
35 pour permettre l'élaboration d'oligonucléotides à moindre dégénérescence. En effet, cet acide aminé qui ne peut être codé que par deux codons, fait partie des acides aminés dont le code est le moins dégénéré et par conséquent

- 30 -

convient tout à fait à l'élaboration d'oligonucléotides à partir de séquences peptidiques.

Les séquences des oligonucléotides utilisés pour le criblage de la banque de cDNA d'eucalyptus dérivées des acides aminés soulignés (I = inosine), sont indiquées ci-après:

peptide 8 (a) Lys-Asn-Trp-Tyr-Cys-Tyr-Gly-Lys

oligonucléotide 8 AA(A/G)AA(C/T)TGGTA(C/T)TG(C/T)TA(T/C)GGIAA

peptide 13 Lys-Gly-Cys-Asp-Gly-Val-Val-His-Thr-Ala-Ser-Pro-Val-Thr-Asp-
Asp

oligonucléotide 13 AA(G/A)GGITG(C/T)GA(C/T)GGIGTIGTICA

peptide 17 Lys-Leu-Arg-Asp-Leu-Gly-Leu-Glu-Phe-Thr-Pro-Val-Lys

oligonucléotide 17 GA(G/A)TT(C/T)ACICCI GTIAA

peptide 18 Lys-Gly-Asp-Leu-Met-Asp-Tyr-Gly-Ser-Leu-Glu-Glu-Ala-Ile-Lys

oligonucléotide 18 AA(G/A)GGIGA(C/T)(C/T)TIATGGA(C/T)TA(C/T)GG

Les conditions d'hybridation utilisées pour le criblage sont les suivantes:

la préhybridation est effectuée pendant 6 à 7 heures dans du 5XSSPE, 0.25%
poudre de lait écrémé, 0.05% SDS (sodium dodecyl sulfate) à 42°C.

L'hybridation est réalisée dans cette même solution, en présence des 4
oligonucléotides marqués en 3' au ddATP α^{32} P, pendant 24 heures à 42°C.

Au terme de ces 24 heures d'hybridation, les filtres sont lavés trois fois
pendant 15 minutes dans du 2XSSC, 0.1% SDS puis mis en contact avec un

film autoradiographique pendant 24 heures à -80°C. Les phages hybridant
avec le groupe d'oligonucléotides ont été purifiés par 2 tours supplémentaires

de criblage ("plaque purification"). Une fois purifiés, les six clones positifs
ont été testés avec chacun des oligonucléotides pris indépendamment. Un

phage a réagi positivement avec les 4 oligonucléotides, il a été traité de
manière à "exciser" le plasmide Bluescript recombinant en suivant les

indications du fabricant (Stratagène). La carte de restriction de l'insert (codant
pour la CCR) contenu dans ce plasmide est schématisée sur la figure 1.

IV Caractérisation et identification de l'ADNc de la CCR

La séquence en acides aminés (représentée par SEQ ID NO 2) déduite de
la séquence nucléotidique (représentée par SEQ ID NO 1) code pour une
protéine de 335 acides aminés dont le poids moléculaire est de 36,5 kD et le

- 31 -

point isoélectrique d'environ 5,8. Il est important de souligner que toutes les séquences peptidiques obtenues à partir de la CCR purifiée sont retrouvées dans la séquence peptidique déduite de la séquence nucléotidique de l'ADNc.

Des recherches d'homologies avec des clones déjà existants ont été effectuées en utilisant les programmes BLAST et FASTA dans toutes les banques protéiques et nucléiques disponibles. Une homologie significative a été trouvée avec une autre réductase du métabolisme des composés phénoliques, la dihydroflavonol réductase (DFR). L'identité est d'environ 40% et la similarité proche de 20% entre la séquence peptidique déduite de l'ADNc de la CCR et les séquences des diverses dihydroflavonol réductase répertoriées dans les banques, ce qui confirme que le clone identifié est différent d'un clone codant pour une DFR.

V Production de CCR recombinante active dans *E. Coli*.

Pour aller plus loin dans l'identification de l'ADNc de la CCR, la protéine recombinante a été produite dans *E. Coli* et son activité enzymatique a été recherchée. Les détails expérimentaux de cette approche sont décrits ci-après.

1- Introduction de l'ADNc dans le vecteur d'expression pT7-7.

Afin de pouvoir cloner l'ADNc dans le vecteur d'expression pT7-7 (disponible commercialement), sous le contrôle du promoteur de la T7 polymérase, nous avons dû introduire un site NdeI à l'ATG de l'ADNc. Ceci a été réalisé à l'aide d'une Taq polymérase lors d'une réaction d'amplification génique par PCR (Polymerase Chain reaction) entre un oligonucléotide muté et une amorce commerciale, T7, situé sur Bluescript en aval de l'extrémité 3' de l'ADNc. Le produit d'amplification obtenu est digéré par KpnI, ce site est ensuite réparé à l'aide du fragment klenow de l'ADN polymérase I avant de soumettre le fragment à une digestion par NdeI, puis le fragment obtenu comportant un site NdeI en 5' et une extrémité franche en 3' est insérée à l'aide d'une ADN T4 ligase dans le vecteur pT7-7 préalablement ouvert par NdeI et SmaI.

La séquence de l'oligonucléotide muté susmentionné est indiquée ci-après.

- 32 -

Les bases soulignées et en italiques ont été modifiées par rapport à la séquence initiale permettant la création d'un site NdeI (CATATG):

5'GGCAATCCCCCATATGCCCGTCGACGC3'

5 2. Surexpression de CCR dans *E. Coli* BL21

La construction ainsi obtenue est introduite dans la souche *E. Coli* BL21 (disponible commercialement) qui porte sur son chromosome le gène de la T7 polymérase sous contrôle du promoteur lac UV5, promoteur inductible par l'IPTG. La culture recombinante est cultivée à 37°C jusqu'à obtention d'une DO mesurée de 1 à 600 nm, puis la production de la CCR est induite par l'ajout d'IPTG (0.25% final) dans le milieu de culture. Des prélèvements sont réalisés à différents temps après induction et les cellules sont lysées selon le protocole décrit par Grima-Pettenati et al. (1993). Après centrifugation le surnageant contenant les protéines solubles, est utilisé pour mesurer l'activité CCR et pour visualiser la production de CCR après électrophorèse en conditions dénaturantes. Sur la figure 2, on note l'apparition d'un polypeptide d'environ 38 kD dont l'intensité croît avec le temps post-induction et qui n'existe pas dans les témoins négatifs (souche BL21 contenant seulement le vecteur pT7-7 sans insert). De plus, la preuve finale de l'identité du clone CCR est apporté par la mesure d'une activité CCR (environ 7 nKat/ml de culture après 3h d'induction à 37°C) dans les extraits protéiques provenant des souches BL21 contenant le pT7-7 + ADNc CCR, seulement.

25 Légendes des figures:

Figure 1: carte de restriction de l'ADNc codant pour la CCR d'eucalyptus.

30 Figure 2: révélation au bleu de Coomassie d'un gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) d'extraits protéiques totaux de *E. Coli* BL21 contenant le vecteur pT7-7 sans insert (piste 6 au temps 0 de l'induction par l'IPTG; 7, 3 heures après induction) et le vecteur pT7-7 contenant le cDNA de la CCR (pistes 1, 2, 3, 4, 5, respectivement, temps 0 de l'induction, 35 30 min, 1, 2, 3 heures après induction), la flèche désigne le monomère CCR.

- 33 -

Figure 3: représentation schématique du plasmide pEUCCR contenant la séquence représentée par SEQ ID NO 1 (et identifiée par CCR dans le plasmide pEUCCR).

5 Figure 4: représentation schématique de la construction d'un vecteur contenant une séquence d'ADN codant pour la CCR d'eucalyptus selon l'invention (ou vecteur CCR sens).

10 Figure 5: représentation schématique de la construction d'un vecteur contenant une séquence d'ADN codant pour un ARN antisens susceptible de s'hybrider avec l'ARNm codant pour la CCR d'eucalyptus selon l'invention (ou vecteur CCR antisens).

15 Concernant l'ADN "source servant à la construction d'un vecteur antisens (ou sens)

L'ARN antisens dérive préférentiellement de la séquence contenue dans le clone pEUCCR. Cette séquence peut être obtenue de différentes manières:

20 1) en coupant avec des enzymes de restriction appropriées la séquence d'ADN (ADNc) de la CCR contenue dans pEUCCR,

2) en réalisant une amplification génique (PCR) à l'aide d'oligonucléotides définis de manière à synthétiser le fragment d'ADN souhaité.

25 Le fragment d'ADN ainsi obtenu est cloné dans un vecteur d'expression des plantes en aval d'un promoteur et en amont d'un terminateur. Le clonage est réalisé de telle façon que le fragment d'ADN est inséré en orientation inverse par rapport au promoteur. Dans ce nouveau vecteur, le brin qui était initialement le brin matrice devient le brin codant et vice versa.

30 Le nouveau vecteur code pour un ARN dont la séquence est complémentaire de la séquence de l'ARN messenger déduit de la séquence contenue dans pEUCCR.

Ainsi les 2 ARN sont complémentaires de par leur séquence mais aussi de par leur orientation (5'-3').

35 Comme source d'ADN pour la transcription de l'ARN antisens il est pratique d'utiliser un clone d'ADNc tel que celui contenu dans pEUCCR.

- 34 -

Exemple de clonage (cf. figure 5)

L'ADNc de la CCR est obtenu par une double digestion (BamHI et KpnI) à partir du vecteur pEUCCR. Le fragment d'ADN ainsi libéré est
5 séparé physiquement du vecteur de clonage par une électrophorèse en gel d'Agarose (Bluescript).

La partie de gel renfermant ce fragment d'ADN est découpée et traitée de façon à obtenir l'ADN purifié (plusieurs méthodes peuvent être utilisées dont la "Low melting Agarose", décrite dans Sambrook et al. susmentionné, le
10 Gene Clean, dont le kit est disponible commercialement).

Le fragment portant les extrémités BamHI et KpnI est "ligué" avec un vecteur d'expression de plantes préalablement digéré par ces mêmes enzymes choisies de façon à ce que le cDNA soit inséré en orientation inverse par rapport au promoteur ³⁵S. Le brin qui sera transcrit dans les plantes sera dans
15 ce cas le brin non codant.

Exemple de clonage sens (cf. figure 4)

Dans ce cas, il n'existe pas de sites de restriction "pratiques" pour
20 réaliser une fusion traductionnelle avec le promoteur ³⁵S du vecteur d'expression. De nouveaux sites plus commodes ont été insérés à l'aide de la technique d'amplification génique (PCR). Deux oligonucléotides ont été définis en 5' et 3' de l'ADNc auxquels ont été ajoutées les séquences des sites reconnus par KpnI et BamHI (NB.: ce sont les mêmes sites qui ont été utilisés
25 pour le clonage antisens susmentionné, mais positionnés différemment par rapport à l'orientation 5'-3').

L'amplification génique conduit à l'obtention d'un fragment contenant la totalité de la séquence codante du cDNA flanquée de 2 sites de restriction. La suite de la procédure est identique à celle décrite pour la construction antisens.

30 Mais, dans ce cas, on a réalisé une fusion du promoteur en phase avec l'ATG de la CCR qui doit conduire à une surexpression de l'ARN messager et donc de la protéine CCR.

B) Obtention de l'ADNc codant pour la CCR de peuplier.

35

L'ADNc a été obtenu par criblage d'une banque d'ADNc construite dans le phage lambda ZAPII (Stratagène) à partir de messagers extraits de xylèmes de peupliers âgés de 2 ans (*Populus trichocarpa*). Les phages ont été criblés à

- 35 -

l'aide de l'ADNc isolé chez *Eucalyptus gunnii* (fragment XhoI de 804 pb de pEUCCR) marqué par random priming au dCTP α^{32} p.

Les conditions d'hybridation utilisées pour le criblage sont les suivantes: la préhybridation est effectuée pendant une nuit à 68°C dans 6X SSC, 5 x Denhardt, 0,5% SDS, 100 μ g d'ADN de sperme de saumon. L'hybridation est réalisée dans le même tampon sans addition de réactif de Denhardt, pendant une nuit à 60°C. Les membranes sont ensuite lavées 2 fois pendant 30 minutes dans 0,1X SSC, 0,5% SDS à 60°C.

Un clone contenant l'ADNc complet a été purifié, sous-cloné et séquencé dans les deux directions. La séquence d'ADNc est celle représentée par SEQ ID NO 3, et la séquence en acides aminés déduite de cette dernière est celle représentée par SEQ ID NO 4.

La comparaison entre les séquences en acides aminés de la CCR d'eucalyptus est celle du peuplier montre une identité de 83% et une homologie de 93% entre ces deux séquences.

C) Obtention de l'ADNc codant pour la CCR de fétuque.

L'ADNc a été obtenu par criblage d'une banque d'ADNc construite dans le phage lambda ZAPII (Stratagène) à partir de messagers extraits de feuilles de *Fetusca arundinacea*. 500 000 phages ont été criblés à l'aide de l'ADNc isolé chez *Eucalyptus gunnii* (fragment XhoI de 804 pb de pEUCCR) marqué par random priming au dCTP α^{32} p.

Les conditions d'hybridation utilisées pour le criblage sont les suivantes: la préhybridation est effectuée pendant 6 heures dans du 5X SSPE, SDS 0,5%, ADN de sperme de saumon 0,1 mg/ml, Ficoll type 400 1 mg/ml, polyvinylpyrrolidone 1 mg/ml, BSA 1 mg/ml à 60°C. L'hybridation est réalisée dans cette même solution, en présence de la sonde marquée au dCTP α^{32} p, pendant 16 heures à 60°C. Les filtres sont alors lavés 2 fois pendant 15 minutes dans du 2X SPPE, 0,1% SDS à 60°C puis 2 fois dans du 0,5X SSPE, 0,1% SDS à 60°C et enfin mis en contact avec un film autoradiographique pendant 3 jours à -80°C. Les phages ont été purifiés par 2 ou 3 tours supplémentaires de criblage.

Une fois purifiés, 3 clones ont été analysés après que le plasmide pBluescript ait été excisé en suivant les indications du fournisseur (Stratagène).

Le séquençage a permis d'éliminer un clone et de montrer que les 2 autres clones étaient identiques et correspondaient à la séquence

- 36 -

nucléotidique représentée par SEQ ID NO 5 codant pour la CCR de fétuque telle que représentée par SEQ ID NO 6.

D) Obtention de l'ADNc codant pour la CCR de tabac.

5

L'ADNc a été obtenu par criblage d'une banque d'ADNc construite dans le phage lambda ZAPII (Stratagène) à partir de messagers extraits de tiges de tabac. Les phages ont été criblés à l'aide de l'ADNc isolé chez *Eucalyptus gunnii* (fragment XhoI de 804 pb de pEUCCR) marqué par random priming au dCTP α^{32} p.

10

Les conditions d'hybridation utilisées pour le criblage sont les suivantes: la préhybridation est effectuée dans 0,25% Marvel, 5X SSPE, 0,05% SDS à 58°C. L'hybridation est réalisée dans ce même tampon, en présence de 50 ng de sonde marquée au dCTP α^{32} p, à 58°C. Les filtres sont alors lavés par 2X SSC/0,1% SDS pendant 20 minutes à température ambiante, 2X SSC/0,1% SDS pendant 20 minutes à 58°C, 1X SSC/0,1% SDS pendant 15 minutes à 58°C.

15

Le plasmide pBluescript SK⁻ contenant le clone d'ADNc (cloné dans le site EcoRI, en utilisant des adaptateurs EcoRI), a été excisé *in vivo*.

20

L'ADNc obtenu est représenté par SEQ ID NO 7, et la séquence en acides aminés déduite de cet ADNc est représentée par SEQ ID NO 8.

- 37 -

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATION GENERALE:

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
- (B) RUE: 3, rue Michel-Ange
- (C) VILLE: PARIS 75016
- (E) PAYS: FRANCE
- (F) CODE POSTAL: F-75016

(ii) TITRE DE L' INVENTION: SEQUENCES D'ADN CODANT POUR LA CINNAMOYL
CoA REDUCTASE, ET SES APPLICATIONS DANS LE
DOMAINE DE LA REGULATION DU TAUX DE LIGNINE CHEZ LES
PLANTES

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 10

(iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 1297 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc pour ARNm

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMPLACEMENT: 136..1140

- 38 -

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

CGGCCGGGAC GACCCGTTCC TCTTCTTCCG GGTCACCGTC ACCATGTTAC ACAACATCTC	60
CGGCTAAAAA AAAAAGGAAA AAAAGCGCAA CCTCCACCTC CTGAACCCCT CTCCCCCTC	120
GCCGGCAATC CCACC ATG CCC GTC GAC GCC CTC CCC GGT TCC GGC CAG ACC	171
Met Pro Val Asp Ala Leu Pro Gly Ser Gly Gln Thr	
1 5 10	
GTC TGC GTC ACC GGC GCC GGC GGG TTC ATC GCC TCC TGG ATT GTC AAG	219
Val Cys Val Thr Gly Ala Gly Gly Phe Ile Ala Ser Trp Ile Val Lys	
15 20 25	
CTT CTC CTC GAG CGA GGC TAC ACC GTG CGA GGA ACC GTC AGG AAC CCA	267
Leu Leu Leu Glu Arg Gly Tyr Thr Val Arg Gly Thr Val Arg Asn Pro	
30 35 40	
GAC GAC CCG AAG AAT GGT CAT CTG AGA GAT CTG GAA GGA GCC AGC GAG	315
Asp Asp Pro Lys Asn Gly His Leu Arg Asp Leu Glu Gly Ala Ser Glu	
45 50 55 60	
AGG CTG ACG CTG TAC AAG GGT GAT CTG ATG GAC TAC GGG AGC TTG GAA	363
Arg Leu Thr Leu Tyr Lys Gly Asp Leu Met Asp Tyr Gly Ser Leu Glu	
65 70 75	
GAA GCC ATC AAG GGG TGC GAC GGC GTC GTC CAC ACC GCC TCT CCG GTC	411
Glu Ala Ile Lys Gly Cys Asp Gly Val Val His Thr Ala Ser Pro Val	
80 85 90	
ACC GAC GAT CCT GAG CAA ATG GTG GAG CCA GCG GTG ATC GGG ACG AAA	459
Thr Asp Asp Pro Glu Gln Met Val Glu Pro Ala Val Ile Gly Thr Lys	
95 100 105	
AAT GTG ATC GTC GCA GCG GCG GAG GCC AAG GTC CGG CGG GTT GTG TTC	507
Asn Val Ile Val Ala Ala Ala Glu Ala Lys Val Arg Arg Val Val Phe	
110 115 120	

ACC TCC TCC ATC GGT GCA GTC ACC ATG GAC CCC AAC CGG GCA GAC GTT 555
Thr Ser Ser Ile Gly Ala Val Thr Met Asp Pro Asn Arg Ala Asp Val
125 130 135 140

GTG GTG GAC GAG TCT TGT TGG AGC GAC CTC GAA TTT TGC AAG AGC ACT 603
Val Val Asp Glu Ser Cys Trp Ser Asp Leu Glu Phe Cys Lys Ser Thr
145 150 155

AAG AAC TGG TAT TGC TAC GGC AAG GCA GTG GCG GAG AAG GCC GCT TGG 651
Lys Asn Trp Tyr Cys Tyr Gly Lys Ala Val Ala Glu Lys Ala Ala Trp
160 165 170

CCA GAG GGC AAG GAG AGA GGG GTT GAC CTC GTG GTG ATT AAC CCT GTG 699
Pro Glu Gly Lys Glu Arg Gly Val Asp Leu Val Val Ile Asn Pro Val
175 180 185

CTC GTG CTT GGA CCG CTC CTT CAG TCG ACG ATC AAT GCG AGC ATC ATC 747
Leu Val Leu Gly Pro Leu Leu Gln Ser Thr Ile Asn Ala Ser Ile Ile
190 195 200

CAC ATC CTC AAG TAC TTG ACT GGC TCA GCC AAG ACC TAC GCC AAC TCG 795
His Ile Leu Lys Tyr Leu Thr Gly Ser Ala Lys Thr Tyr Ala Asn Ser
205 210 215 220

GTC	CAG	GCG	TAC	GTG	CAC	GTC	AAG	GAC	GTC	GCG	CTT	GCC	CAC	GTC	CTT	843
Val	Gln	Ala	Tyr	Val	His	Val	Lys	Asp	Val	Ala	Leu	Ala	His	Val	Leu	
				225					230					235		

GTC TTG GAG ACC CCA TCC GCC TCA GGC CGC TAT TTG TGC GCC GAG AGC 891
Val Leu Glu Thr Pro Ser Ala Ser Gly Arg Tyr Leu Cys Ala Glu Ser
240 245 250

GTC CTC CAC CGT GGC GAT GTG GTG GAA ATC CTT GCC AAG TTC TTC CCT 939
Val Leu His Arg Gly Asp Val Val Glu Ile Leu Ala Lys Phe Phe Pro
255 260 265

- 40 -

GAG TAT AAT GTA CCG ACC AAG TGC TCT GAT GAG GTG AAC CCA AGA GTA	987
Glu Tyr Asn Val Pro Thr Lys Cys Ser Asp Glu Val Asn Pro Arg Val	
270 275 280	
AAA CCA TAC AAG TTC TCC AAC CAG AAG CTG AGA GAC TTG GGG CTC GAG	1035
Lys Pro Tyr Lys Phe Ser Asn Gln Lys Leu Arg Asp Leu Gly Leu Glu	
285 290 295 300	
TTC ACC CCG GTG AAG CAG TGC CTG TAC GAA ACT GTC AAG AGC TTG CAG	1083
Phe Thr Pro Val Lys Gln Cys Leu Tyr Glu Thr Val Lys Ser Leu Gln	
305 310 315	
GAG AAA GGC CAC CTA CCA GTC CCC TCC CCG CCG GAA GAT TCG GTG CGT	1131
Glu Lys Gly His Leu Pro Val Pro Ser Pro Pro Glu Asp Ser Val Arg	
320 325 330	
ATT CAG GGA TGATCTTAGA TCCATCACGG TGCGCATTTG TAATCCGGAG	1180
Ile Gln Gly	
335	
AAATGAGAGA AACATGTGGG AATTGTGTTG TACTTTTCTA AGTCAAACCT GGAGATACCA	1240
ACCCTGAGTT CTGCATTGGA ATGGAAGTTG TCAATTGTTC CAAAAAAAAA AAAAAAA	1297

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 335 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

Met	Pro	Val	Asp	Ala	Leu	Pro	Gly	Ser	Gly	Gln	Thr	Val	Cys	Val	Thr
1						5					10				15

- 41 -

Gly Ala Gly Gly Phe Ile Ala Ser Trp Ile Val Lys Leu Leu Leu Glu
20 25 30

Arg Gly Tyr Thr Val Arg Gly Thr Val Arg Asn Pro Asp Asp Pro Lys
35 40 45

Asn Gly His Leu Arg Asp Leu Glu Gly Ala Ser Glu Arg Leu Thr Leu
50 55 60

Tyr Lys Gly Asp Leu Met Asp Tyr Gly Ser Leu Glu Glu Ala Ile Lys
65 70 75 80

Gly Cys Asp Gly Val Val His Thr Ala Ser Pro Val Thr Asp Asp Pro
85 90 95

Glu Gln Met Val Glu Pro Ala Val Ile Gly Thr Lys Asn Val Ile Val
100 105 110

Ala Ala Ala Glu Ala Lys Val Arg Arg Val Val Phe Thr Ser Ser Ile
115 120 125

Gly Ala Val Thr Met Asp Pro Asn Arg Ala Asp Val Val Val Asp Glu
130 135 140

Ser Cys Trp Ser Asp Leu Glu Phe Cys Lys Ser Thr Lys Asn Trp Tyr
145 150 155 160

Cys Tyr Gly Lys Ala Val Ala Glu Lys Ala Ala Trp Pro Glu Gly Lys
165 170 175

Glu Arg Gly Val Asp Leu Val Val Ile Asn Pro Val Leu Val Leu Gly
180 185 190

Pro Leu Leu Gln Ser Thr Ile Asn Ala Ser Ile Ile His Ile Leu Lys
195 200 205

- 42 -

Tyr Leu Thr Gly Ser Ala Lys Thr Tyr Ala Asn Ser Val Gln Ala Tyr
 210 215 220

Val His Val Lys Asp Val Ala Leu Ala His Val Leu Val Leu Glu Thr
 225 230 235 240

Pro Ser Ala Ser Gly Arg Tyr Leu Cys Ala Glu Ser Val Leu His Arg
 245 250 255

Gly Asp Val Val Glu Ile Leu Ala Lys Phe Phe Pro Glu Tyr Asn Val
 260 265 270

Pro Thr Lys Cys Ser Asp Glu Val Asn Pro Arg Val Lys Pro Tyr Lys
 275 280 285

Phe Ser Asn Gln Lys Leu Arg Asp Leu Gly Leu Glu Phe Thr Pro Val
 290 295 300

Lys Gln Cys Leu Tyr Glu Thr Val Lys Ser Leu Gln Glu Lys Gly His
 305 310 315 320

Leu Pro Val Pro Ser Pro Pro Glu Asp Ser Val Arg Ile Gln Gly
 325 330 335

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 1376 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc pour ARNm

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMPLACEMENT: 99..1112

- 43 -

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

GAAAACACAC CTCCTCTCTT CTTTGTCTCT GTCTGTTCTC CACTTTCCCA GTCACCAAAC	60
TCGTATGCAT ATAATTACAT TTATCTAAAT ATAACAAC ATG CCT GTT GAT GCT	113
Met Pro Val Asp Ala	
1 5	
TCA TCA CTT TCA GGC CAA GGC CAA ACT ATC TGT GTC ACC GGG GGT GGT	161
Ser Ser Leu Ser Gly Gln Gly Gln Thr Ile Cys Val Thr Gly Gly Gly	
10 15 20	
GGT TTC ATT GCT TCT TGG ATG GTT AAA CTT CTT TTA GAT AAA GGT TAC	209
Gly Phe Ile Ala Ser Trp Met Val Lys Leu Leu Leu Asp Lys Gly Tyr	
25 30 35	
ACT GTT AGA GGA ACT GCG AGG AAC CCA GCT GAT CCC AAG AAT TCT CAT	257
Thr Val Arg Gly Thr Ala Arg Asn Pro Ala Asp Pro Lys Asn Ser His	
40 45 50	
TTG AGG GAG CTT GAA GGA GCT GAA GAA AGA TTA ACT TTA TGC AAA GCT	305
Leu Arg Glu Leu Glu Gly Ala Glu Glu Arg Leu Thr Leu Cys Lys Ala	
55 60 65	
GAT CTT CTT GAT TAT GAG TCT CTT AAA GAG GGT ATT CAA GGG TGT GAT	353
Asp Leu Leu Asp Tyr Glu Ser Leu Lys Glu Gly Ile Gln Gly Cys Asp	
70 75 80 85	
GGT GTT TTC CAC ACT GCT TCT CCT GTC ACA GAT GAT CCG GAA GAA ATG	401
Gly Val Phe His Thr Ala Ser Pro Val Thr Asp Asp Pro Glu Glu Met	
90 95 100	
GTG GAG CCA GCA GTG AAC GGG ACC AAA AAT GTG ATA ATT GCG GCG GCT	449
Val Glu Pro Ala Val Asn Gly Thr Lys Asn Val Ile Ile Ala Ala Ala	
105 110 115	

- 44 -

GAG GCC AAA GTC CGA CGA GTG GTG TTC ACG TCA TCA ATT GGC GCT GTG	497
Glu Ala Lys Val Arg Arg Val Val Phe Thr Ser Ser Ile Gly Ala Val	
120 125 130	
TAC ATG GAT CCC AAT AAG GGC CCA GAT GTT GTC ATT GAT GAG TCT TGC	545
Tyr Met Asp Pro Asn Lys Gly Pro Asp Val Val Ile Asp Glu Ser Cys	
135 140 145	
TGG AGT GAT CTT GAA TTC TGC AAG AAC ACC AAG AAT TGG TAT TGC TAT	593
Trp Ser Asp Leu Glu Phe Cys Lys Asn Thr Lys Asn Trp Tyr Cys Tyr	
150 155 160 165	
GGA AAG GCT GTG GCA GAA CAA GCT GCA TGG GAT ATG GCT AAG GAG AAA	641
Gly Lys Ala Val Ala Glu Gln Ala Ala Trp Asp Met Ala Lys Glu Lys	
170 175 180	
GGG GTG GAC CTA GTG GTG GTT AAC CCA GTG CTG GTG CTT GGA CCA TTG	689
Gly Val Asp Leu Val Val Val Asn Pro Val Leu Val Leu Gly Pro Leu	
185 190 195	
TTG CAG CCC ACT GTC AAT GCT AGC ATC ACT CAC ATC CTC AAG TAC CTC	737
Leu Gln Pro Thr Val Asn Ala Ser Ile Thr His Ile Leu Lys Tyr Leu	
200 205 210	
ACC GGC TCA GCC AAG ACA TAT GCT AAC TCT GTT CAA GCT TAT GTG CAT	785
Thr Gly Ser Ala Lys Thr Tyr Ala Asn Ser Val Gln Ala Tyr Val His	
215 220 225	
GTT AGG GAT GTG GCA CTA GCC CAC ATT TTA GTC TTT GAG ACG CCT TCC	833
Val Arg Asp Val Ala Leu Ala His Ile Leu Val Phe Glu Thr Pro Ser	
230 235 240 245	
GCC TCC GGC CGT TAC CTT TGC TCT GAG AGC GTT CTC CAC CGT GGA GAG	881
Ala Ser Gly Arg Tyr Leu Cys Ser Glu Ser Val Leu His Arg Gly Glu	
250 255 260	

- 45 -

GTG GTG GAA ATC CTT GCA AAG TTC TTC CCT GAG TAC CCC ATC CCT ACC	929
Val Val Glu Ile Leu Ala Lys Phe Phe Pro Glu Tyr Pro Ile Pro Thr	
265 270 275	
 AAG TGC TCA GAT GAG AAG AAC CCA AGA AAA CAA CCT TAC AAG TTC TCA	977
Lys Cys Ser Asp Glu Lys Asn Pro Arg Lys Gln Pro Tyr Lys Phe Ser	
280 285 290	
 AAC CAG AAG CTA AGG GAT CTG GGT TTC GAA TTC ACC CCA GTA AAG CAG	1025
Asn Gln Lys Leu Arg Asp Leu Gly Phe Glu Phe Thr Pro Val Lys Gln	
295 300 305	
 TGT CTG TAT GAA ACT GTT AAG AGT TTG CAG GAA AAG GGT CAC CTT CCA	1073
Cys Leu Tyr Glu Thr Val Lys Ser Leu Gln Glu Lys Gly His Leu Pro	
310 315 320 325	
 ATC CCA AAA CAA GCT GCA GAA GAG TCT TTG AAA ATT CAA TAAGGCCTCT	1122
Ile Pro Lys Gln Ala Ala Glu Glu Ser Leu Lys Ile Gln	
330 335	
 TGGA ACTATT TATTAGGATT GTTCCATACC CCAAGTTTGG ATCGCAAATG CTAGGGAAAG	1182
 GAGCATATTA AAGAATGCCA ATGTGCAGGT GTTTTAGTAT TTTACATGAA GAACTCTGAT	1242
 TATCCTTG TG CTTATAATAA TTTTTTTC AA GTGAGTGTCT TCAAATGTTC AACTTGTATT	1302
 TGTG GTTGTC TAACTTTATC CAGTTTCAAT ATAAAAGAGG AACGATTCTA TGTCTTAAAA	1362
 AAAAAAAAAAAA AAAA	1376

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 338 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

- 46 -

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

```

Met Pro Val Asp Ala Ser Ser Leu Ser Gly Gln Gly Gln Thr Ile Cys
 1              5              10              15

Val Thr Gly Gly Gly Gly Phe Ile Ala Ser Trp Met Val Lys Leu Leu
          20              25              30

Leu Asp Lys Gly Tyr Thr Val Arg Gly Thr Ala Arg Asn Pro Ala Asp
          35              40              45

Pro Lys Asn Ser His Leu Arg Glu Leu Glu Gly Ala Glu Glu Arg Leu
          50              55              60

Thr Leu Cys Lys Ala Asp Leu Leu Asp Tyr Glu Ser Leu Lys Glu Gly
 65              70              75              80

Ile Gln Gly Cys Asp Gly Val Phe His Thr Ala Ser Pro Val Thr Asp
          85              90              95

Asp Pro Glu Glu Met Val Glu Pro Ala Val Asn Gly Thr Lys Asn Val
          100             105             110

Ile Ile Ala Ala Ala Glu Ala Lys Val Arg Arg Val Val Phe Thr Ser
          115             120             125

Ser Ile Gly Ala Val Tyr Met Asp Pro Asn Lys Gly Pro Asp Val Val
          130             135             140

Ile Asp Glu Ser Cys Trp Ser Asp Leu Glu Phe Cys Lys Asn Thr Lys
          145             150             155             160

Asn Trp Tyr Cys Tyr Gly Lys Ala Val Ala Glu Gln Ala Ala Trp Asp
          165             170             175

```

- 47 -

Met Ala Lys Glu Lys Gly Val Asp Leu Val Val Val Asn Pro Val Leu
 180 185 190

Val Leu Gly Pro Leu Leu Gln Pro Thr Val Asn Ala Ser Ile Thr His
 195 200 205

Ile Leu Lys Tyr Leu Thr Gly Ser Ala Lys Thr Tyr Ala Asn Ser Val
 210 215 220

Gln Ala Tyr Val His Val Arg Asp Val Ala Leu Ala His Ile Leu Val
 225 230 235 240

Phe Glu Thr Pro Ser Ala Ser Gly Arg Tyr Leu Cys Ser Glu Ser Val
 245 250 255

Leu His Arg Gly Glu Val Val Glu Ile Leu Ala Lys Phe Phe Pro Glu
 260 265 270

Tyr Pro Ile Pro Thr Lys Cys Ser Asp Glu Lys Asn Pro Arg Lys Gln
 275 280 285

Pro Tyr Lys Phe Ser Asn Gln Lys Leu Arg Asp Leu Gly Phe Glu Phe
 290 295 300

Thr Pro Val Lys Gln Cys Leu Tyr Glu Thr Val Lys Ser Leu Gln Glu
 305 310 315 320

Lys Gly His Leu Pro Ile Pro Lys Gln Ala Ala Glu Glu Ser Leu Lys
 325 330 335

Ile Gln

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 1273 paires de bases

- 48 -

- (B) TYPE: acide nucléique
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc pour ARNm

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

- (A) NOM/CLE: CDS
 (B) EMPLACEMENT: 66..1091

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

TCGTAGCTCT TCCCTTTCAC CAACAAGCTA GTTTAGACAA GTACAGTGGT ACTGTAAGAG	60
CAACA ATG ACC GTT GTC GAC GCC GCC GCG CCG CAG CTG CCT GGC CAT	107
Met Thr Val Val Asp Ala Ala Ala Pro Gln Leu Pro Gly His	
1 5 10	
GGG CAG ACC GTG TGC GTC ACC GGC GCC GCG GGG TAC ATC GCG TCG GGG	155
Gly Gln Thr Val Cys Val Thr Gly Ala Ala Gly Tyr Ile Ala Ser Gly	
15 20 25 30	
CTC GTC AAG CTG CTC CTG GAG AGA GGC TAC ACC GTG AAG GGC ACA GTG	203
Leu Val Lys Leu Leu Leu Glu Arg Gly Tyr Thr Val Lys Gly Thr Val	
35 40 45	
AGG AAC CCA GAT GAT CCC AAG AAC GCC CAC CTG AAG GCG CTG GAC GGC	251
Arg Asn Pro Asp Asp Pro Lys Asn Ala His Leu Lys Ala Leu Asp Gly	
50 55 60	
GCC ACC AAG AGG CTG ATC CTC TGC AAA GCC GAC CTC CTC GAC TAC GAC	299
Ala Thr Lys Arg Leu Ile Leu Cys Lys Ala Asp Leu Leu Asp Tyr Asp	
65 70 75	
GCC ATA TGC GCC GCC GTC GAG GGC TGC CAC GGC GTG TTC CAC ACC GCC	347
Ala Ile Cys Ala Ala Val Glu Gly Cys His Gly Val Phe His Thr Ala	
80 85 90	

- 49 -

TCT CCA GTC ACC GAT GAT CCT GAG CAG ATG GTG GAG CCG GCG GTG CGG	395
Ser Pro Val Thr Asp Asp Pro Glu Gln Met Val Glu Pro Ala Val Arg	
95 100 105 110	
 GGC ACG GAG TAC GTG ATC AAC GCG GCA GCG GAT GCG GGA ACG GTG CGC	443
Gly Thr Glu Tyr Val Ile Asn Ala Ala Ala Asp Ala Gly Thr Val Arg	
115 120 125	
 CGG GTG GTG TTC ACG TCG TCA ATC GGT GCC ATC ACC ATG GAC CCC AAC	491
Arg Val Val Phe Thr Ser Ser Ile Gly Ala Ile Thr Met Asp Pro Asn	
130 135 140	
 CGC GGT CCT GAC GTA GTC GTC AAT GAG TCC TGC TGG AGC GAC CTC GAA	539
Arg Gly Pro Asp Val Val Val Asn Glu Ser Cys Trp Ser Asp Leu Glu	
145 150 155	
 TTC TGC AAG AAA ACC AAG AAC TGG TAC TGC TAC GGC AAG GCC GTG GCG	587
Phe Cys Lys Lys Thr Lys Asn Trp Tyr Cys Tyr Gly Lys Ala Val Ala	
160 165 170	
 GAG CAG GCT GCG TGG GAG GCG GCC AGG AAG CGC GGC ATC GAC CTC GTC	635
Glu Gln Ala Ala Trp Glu Ala Ala Arg Lys Arg Gly Ile Asp Leu Val	
175 180 185 190	
 GTC GTG AAC CCT GTG CTC GTG GTA GGG CCG CTG CTG CAA CCA ACG GTG	683
Val Val Asn Pro Val Leu Val Val Gly Pro Leu Leu Gln Pro Thr Val	
195 200 205	
 AAC GCT AGC GCC GCA CAC ATC CTC AAG TAC CTC GAC GGC TCG GCC AAG	731
Asn Ala Ser Ala Ala His Ile Leu Lys Tyr Leu Asp Gly Ser Ala Lys	
210 215 220	
 AAG TAC GCC AAC GCT GTG CAG TCA TAC GTA GAC GTG CGT GAC GTA GCC	779
Lys Tyr Ala Asn Ala Val Gln Ser Tyr Val Asp Val Arg Asp Val Ala	
225 230 235	

- 50 -

GGC GCG CAC ATC CGG GTG TTC GAG GCG CCT GAG GCG TCG GGC CGG TAC	827
Gly Ala His Ile Arg Val Phe Glu Ala Pro Glu Ala Ser Gly Arg Tyr	
240 245 250	
CTC TGC GCC GAG CGC GTG CTG CAC CGT GGG GAC GTT GTC CAA ATC CTC	875
Leu Cys Ala Glu Arg Val Leu His Arg Gly Asp Val Val Gln Ile Leu	
255 260 265 270	
AGC AAA CTC TTG CCT GAG TAC CCT GTG CCA ACA AGG TGC TCT GAT GAA	923
Ser Lys Leu Leu Pro Glu Tyr Pro Val Pro Thr Arg Cys Ser Asp Glu	
275 280 285	
GTG AAC CCA CGG AAG CAG CCT TAT AAG ATG TCC AAC CAG AAG CTG CAG	971
Val Asn Pro Arg Lys Gln Pro Tyr Lys Met Ser Asn Gln Lys Leu Gln	
290 295 300	
GAT CTT GGC CTC CAG TTC ACT CCT GTG AAC GAC TCT CTG TAT GAG ACC	1019
Asp Leu Gly Leu Gln Phe Thr Pro Val Asn Asp Ser Leu Tyr Glu Thr	
305 310 315	
GTG AAG AGC CTC CAG GAG AAG GGA CAT CTC CTA GTA CCA AGC AAA CCC	1067
Val Lys Ser Leu Gln Glu Lys Gly His Leu Leu Val Pro Ser Lys Pro	
320 325 330	
GAG GGA TTA AAC GGT GTA ACG GCA TGATACTGCT AAAGAAGCAG CAGAGTTCAC	1121
Glu Gly Leu Asn Gly Val Thr Ala	
335 340	
GTGCTCCTGT AACATGGTCA AACATGAGTT GTTTTCTGT ATAAATTCTA TCCAGTATCG	1181
TGTTATTAA GTGAACTAAG AGAACAGAAT ATTGTATCAT CTTGATGTC CAATACCTGG	1241
AAGTGATTTG TTTTGCCACC TAAAAAAAAA AA	1273

- 51 -

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 342 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

Met Thr Val Val Asp Ala Ala Ala Pro Gln Leu Pro Gly His Gly Gln
 1 5 10 15

Thr Val Cys Val Thr Gly Ala Ala Gly Tyr Ile Ala Ser Gly Leu Val
 20 25 30

Lys Leu Leu Leu Glu Arg Gly Tyr Thr Val Lys Gly Thr Val Arg Asn
 35 40 45

Pro Asp Asp Pro Lys Asn Ala His Leu Lys Ala Leu Asp Gly Ala Thr
 50 55 60

Lys Arg Leu Ile Leu Cys Lys Ala Asp Leu Leu Asp Tyr Asp Ala Ile
 65 70 75 80

Cys Ala Ala Val Glu Gly Cys His Gly Val Phe His Thr Ala Ser Pro
 85 90 95

Val Thr Asp Asp Pro Glu Gln Met Val Glu Pro Ala Val Arg Gly Thr
 100 105 110

Glu Tyr Val Ile Asn Ala Ala Ala Asp Ala Gly Thr Val Arg Arg Val
 115 120 125

Val Phe Thr Ser Ser Ile Gly Ala Ile Thr Met Asp Pro Asn Arg Gly
 130 135 140

- 32 -

Pro Asp Val Val Val Asn Glu Ser Cys Trp Ser Asp Leu Glu Phe Cys
145 150 155 160

Lys Lys Thr Lys Asn Trp Tyr Cys Tyr Gly Lys Ala Val Ala Glu Gln
165 170 175

Ala Ala Trp Glu Ala Ala Arg Lys Arg Gly Ile Asp Leu Val Val Val
180 185 190

Asn Pro Val Leu Val Val Gly Pro Leu Leu Gln Pro Thr Val Asn Ala
195 200 205

Ser Ala Ala His Ile Leu Lys Tyr Leu Asp Gly Ser Ala Lys Lys Tyr
210 215 220

Ala Asn Ala Val Gln Ser Tyr Val Asp Val Arg Asp Val Ala Gly Ala
225 230 235 240

His Ile Arg Val Phe Glu Ala Pro Glu Ala Ser Gly Arg Tyr Leu Cys
245 250 255

Ala Glu Arg Val Leu His Arg Gly Asp Val Val Gln Ile Leu Ser Lys
260 265 270

Leu Leu Pro Glu Tyr Pro Val Pro Thr Arg Cys Ser Asp Glu Val Asn
275 280 285

Pro Arg Lys Gln Pro Tyr Lys Met Ser Asn Gln Lys Leu Gln Asp Leu
290 295 300

Gly Leu Gln Phe Thr Pro Val Asn Asp Ser Leu Tyr Glu Thr Val Lys
305 310 315 320

Ser Leu Gln Glu Lys Gly His Leu Leu Val Pro Ser Lys Pro Glu Gly
325 330 335

Leu Asn Gly Val Thr Ala
340

- 53 -

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 1293 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc pour ARNm

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMBLEMENT: 95..1108

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

```

CCGAGCCTAT TTCTTCCCTA TATCCACTCA TCCTTGCTT ATATCATCAT CATCATCATC      60

TACCTAAACC TGAGCTCAAC AGAAAAGTAA TACC ATG CCG TCA GTT TCC GGC      112
                Met Pro Ser Val Ser Gly
                        1                5

CAA ATC GTT TGT GTT ACT GGC GCC GGA GGT TTC ATC GCC TCT TGG CTC      160
Gln Ile Val Cys Val Thr Gly Ala Gly Gly Phe Ile Ala Ser Trp Leu
                10                15                20

GTT AAA ATT CTT CTG GAA AAA GGC TAC ACT GTT AGA GGA ACA GTA CGA      208
Val Lys Ile Leu Leu Glu Lys Gly Tyr Thr Val Arg Gly Thr Val Arg
                25                30                35

AAT CCA GAT GAT CGA AAA AAT AGT CAT TTG AGG GAG CTT GAA CGA GCA      256
Asn Pro Asp Asp Arg Lys Asn Ser His Leu Arg Glu Leu Glu Arg Ala
                40                45                50

AAA GAG ACA TTG ACT CTG TGC AGA GCT GAT CTT CTT GAT TTT CAG AGT      304
Lys Glu Thr Leu Thr Leu Cys Arg Ala Asp Leu Leu Asp Phe Gln Ser
                55                60                65                70

```


- 54 -

TTG CGA GAA GCA ATC AGC GGC TGT GAC GGA GTT TTC CAC ACA CGT TCT	352
Leu Arg Glu Ala Ile Ser Gly Cys Asp Gly Val Phe His Thr Arg Ser	
75 80 85	
CCT GTC ACT GAT GAT CCA GAA CAA ATG GTG GAG CCA GCA GTT ATT GGT	400
Pro Val Thr Asp Asp Pro Glu Gln Met Val Glu Pro Ala Val Ile Gly	
90 95 100	
ACA AAG AAT GTG ATA ACG GCA GCA GCA GAG GCC AAG GTG CGA CGT GTG	448
Thr Lys Asn Val Ile Thr Ala Ala Ala Glu Ala Lys Val Arg Arg Val	
105 110 115	
GTG TTC ACT TCG TCA ATT GGT GCT GTG TAT ATG GAC CCA AAC AGG GAC	496
Val Phe Thr Ser Ser Ile Gly Ala Val Tyr Met Asp Pro Asn Arg Asp	
120 125 130	
CCT GAT AAG GTT GTC GAC GAG ACT TGT TGG AGT GAT CCT GAC TTC TGC	544
Pro Asp Lys Val Val Asp Glu Thr Cys Trp Ser Asp Pro Asp Phe Cys	
135 140 145 150	
AAA AAC ACC AAG AAT TGG TAT TGT TAT GGG AAG ATG GTG GCA GAA CAA	592
Lys Asn Thr Lys Asn Trp Tyr Cys Tyr Gly Lys Met Val Ala Glu Gln	
155 160 165	
GCA GCA TGG GAC GAA GCA AGG GAG AAA GGA GTC GAT TTG GTG GCA ATC	640
Ala Ala Trp Asp Glu Ala Arg Glu Lys Gly Val Asp Leu Val Ala Ile	
170 175 180	
AAC CCA GTG TTG GTG CTT GGA CCA CTG CTC CAA CAG AAT GTG AAT GCC	688
Asn Pro Val Leu Val Leu Gly Pro Leu Leu Gln Gln Asn Val Asn Ala	
185 190 195	
AGT GTT CTT CAC ATC CAC AAG TAC CTA ACT GGC TCT GCT AAA ACA TAT	736
Ser Val Leu His Ile His Lys Tyr Leu Thr Gly Ser Ala Lys Thr Tyr	
200 205 210	

- 55 -

ACG TCC AAT TCA CTT CAG GCA TAT GTT CAT GTT AGG GAT GTG GCT TTA	784
Thr Ser Asn Ser Leu Gln Ala Tyr Val His Val Arg Asp Val Ala Leu	
215 220 225 230	
CGT CAC ATA CTT GTG TAC GAG ACA CCT TCT GCA TCT GGC CGT TAT CTC	832
Arg His Ile Leu Val Tyr Glu Thr Pro Ser Ala Ser Gly Arg Tyr Leu	
235 240 245	
TGT GCC GAG AGT GTG CTG CAT CGC TGC GAT GTG GTT GAA ATT CTC GCC	880
Cys Ala Glu Ser Val Leu His Arg Cys Asp Val Val Glu Ile Leu Ala	
250 255 260	
AAA TTC TTC CCG GAG TAT CCT ATC CCC ACC AAG TGT TCA GAT GTG ACG	928
Lys Phe Phe Pro Glu Tyr Pro Ile Pro Thr Lys Cys Ser Asp Val Thr	
265 270 275	
AAG CCA AGG GTA AAA CCG TAC AAA TTC TCA AAC CAA AAG CTA AAG GAT	976
Lys Pro Arg Val Lys Pro Tyr Lys Phe Ser Asn Gln Lys Leu Lys Asp	
280 285 290	
TTG GGT CTG GAG TTT ACA CCA GTA CAA TGC TTA TAT GAA ACG GTG AAG	1024
Leu Gly Leu Glu Phe Thr Pro Val Gln Cys Leu Tyr Glu Thr Val Lys	
295 300 305 310	
AGT CTA CAA GAG AAA GGT CAC CTT CCA ATT CCT ACT CAA AAG GAT GAG	1072
Ser Leu Gln Glu Lys Gly His Leu Pro Ile Pro Thr Gln Lys Asp Glu	
315 320 325	
ATT ATT CGA ATT CAG TCT GAG AAA TTC AGA AGC TCT TAGCATGTAT	1118
Ile Ile Arg Ile Gln Ser Glu Lys Phe Arg Ser Ser	
330 335	
TGAGGAAAAG GGATCAATGG TTAAAGTTGA CCATGGCGTT GTCCCTTTAT GTACCAAGAC	1178
CAAATGCACC TAGAAATTTA CTTGTCTACT CTGTTGTACT TTTACTTGTC ATGGAAATGT	1238
TTTtagtGTT TTCATTGTTA TGAGATATAT TTTGGTGTAA AAAAAAAAAA AAAAA	1293

- 56 -

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 338 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

Met Pro Ser Val Ser Gly Gln Ile Val Cys Val Thr Gly Ala Gly Gly
 1 5 10 15

Phe Ile Ala Ser Trp Leu Val Lys Ile Leu Leu Glu Lys Gly Tyr Thr
 20 25 30

Val Arg Gly Thr Val Arg Asn Pro Asp Asp Arg Lys Asn Ser His Leu
 35 40 45

Arg Glu Leu Glu Arg Ala Lys Glu Thr Leu Thr Leu Cys Arg Ala Asp
 50 55 60

Leu Leu Asp Phe Gln Ser Leu Arg Glu Ala Ile Ser Gly Cys Asp Gly
 65 70 75 80

Val Phe His Thr Arg Ser Pro Val Thr Asp Asp Pro Glu Gln Met Val
 85 90 95

Glu Pro Ala Val Ile Gly Thr Lys Asn Val Ile Thr Ala Ala Ala Glu
 100 105 110

Ala Lys Val Arg Arg Val Val Phe Thr Ser Ser Ile Gly Ala Val Tyr
 115 120 125

Met Asp Pro Asn Arg Asp Pro Asp Lys Val Val Asp Glu Thr Cys Trp
 130 135 140

- 57 -

Ser Asp Pro Asp Phe Cys Lys Asn Thr Lys Asn Trp Tyr Cys Tyr Gly
 145 150 155 160

Lys Met Val Ala Glu Gln Ala Ala Trp Asp Glu Ala Arg Glu Lys Gly
 165 170 175

Val Asp Leu Val Ala Ile Asn Pro Val Leu Val Leu Gly Pro Leu Leu
 180 185 190

Gln Gln Asn Val Asn Ala Ser Val Leu His Ile His Lys Tyr Leu Thr
 195 200 205

Gly Ser Ala Lys Thr Tyr Thr Ser Asn Ser Leu Gln Ala Tyr Val His
 210 215 220

Val Arg Asp Val Ala Leu Arg His Ile Leu Val Tyr Glu Thr Pro Ser
 225 230 235 240

Ala Ser Gly Arg Tyr Leu Cys Ala Glu Ser Val Leu His Arg Cys Asp
 245 250 255

Val Val Glu Ile Leu Ala Lys Phe Phe Pro Glu Tyr Pro Ile Pro Thr
 260 265 270

Lys Cys Ser Asp Val Thr Lys Pro Arg Val Lys Pro Tyr Lys Phe Ser
 275 280 285

Asn Gln Lys Leu Lys Asp Leu Gly Leu Glu Phe Thr Pro Val Gln Cys
 290 295 300

Leu Tyr Glu Thr Val Lys Ser Leu Gln Glu Lys Gly His Leu Pro Ile
 305 310 315 320

Pro Thr Gln Lys Asp Glu Ile Ile Arg Ile Gln Ser Glu Lys Phe Arg
 325 330 335

Ser Ser

- 58 -

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 1297 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc pour ARNm

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMPLACEMENT: 136..1140

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

```

CGGCCGGGAC GACCCGTTCC TCTTCTTCCG GGTACCGTC ACCATGTTAC ACAACATCTC      60

CGGCTAAAAA AAAAAGGAAA AAAAGCGCAA CCTCCACCTC CTGAACCCCT CTCCCCCCTC      120

GCCGGCAATC CCACC ATG CCC GTC GAC GCC CTC CCC GGT TCC GGC CAG ACC      171
      Met Pro Val Asp Ala Leu Pro Gly Ser Gly Gln Thr
              1              5              10

GTC TGC GTC ACC GGC GCC GGC GGG TTC ATC GCC TCC TGG ATT GTC AAG      219
Val Cys Val Thr Gly Ala Gly Gly Phe Ile Ala Ser Trp Ile Val Lys
      15              20              25

CTT CTC CTC GAG CGA GGC TAC ACC GTG CGA GGA ACC GTC AGG AAC CCA      267
Leu Leu Leu Glu Arg Gly Tyr Thr Val Arg Gly Thr Val Arg Asn Pro
      30              35              40

GAC GAC CCG AAG AAT GGT CAT CTG AGA GAT CTG GAA GGA GCC AGC GAG      315
Asp Asp Pro Lys Asn Gly His Leu Arg Asp Leu Glu Gly Ala Ser Glu
      45              50              55              60

AGG CTG ACG CTG TAC AAG GGT GAT CTG ATG GAC GAC GGG AGC TTG GAA      363
Arg Leu Thr Leu Tyr Lys Gly Asp Leu Met Asp Asp Gly Ser Leu Glu
      65              70              75

```

- 59 -

GAA GCC ATC AAG GGG TGC GAC GGC GTC GTC CAC ACC GCC TCT CCG GTC	411
Glu Ala Ile Lys Gly Cys Asp Gly Val Val His Thr Ala Ser Pro Val	
80 85 90	
ACC GAC GAT CCT GAG CAA ATG GTG GAG CCA GCG GTG ATC GGG ACG AAA	459
Thr Asp Asp Pro Glu Gln Met Val Glu Pro Ala Val Ile Gly Thr Lys	
95 100 105	
AAT GTG ATC GTC GCA GCG GCG GAG GCC AAG GTC CGG CGG GTT GTG TTC	507
Asn Val Ile Val Ala Ala Ala Glu Ala Lys Val Arg Arg Val Val Phe	
110 115 120	
ACC TCC TCC ATC GGT GCA GTC ACC ATG GAC CCC AAC CGG GCA GAC GTT	555
Thr Ser Ser Ile Gly Ala Val Thr Met Asp Pro Asn Arg Ala Asp Val	
125 130 135 140	
GTG GTG GAC GAG TCT TGT TGG AGC GAC CTC GAA TTT TGC AAG AGC ACT	603
Val Val Asp Glu Ser Cys Trp Ser Asp Leu Glu Phe Cys Lys Ser Thr	
145 150 155	
AAG AAC TGG TAT TGC TAC GGC AAG GCA GTG GCG GAG AAG GCC GCT TGG	651
Lys Asn Trp Tyr Cys Tyr Gly Lys Ala Val Ala Glu Lys Ala Ala Trp	
160 165 170	
CCA GAG GGC AAG GAG AGA GGG GTT GAC CTC GTG GTG ATT AAC CCT GTG	699
Pro Glu Gly Lys Glu Arg Gly Val Asp Leu Val Val Ile Asn Pro Val	
175 180 185	
CTC GTG CTT GGA CCG CTC CTT CAG TCG ACG ATC AAT GCG AGC ATC ATC	747
Leu Val Leu Gly Pro Leu Leu Gln Ser Thr Ile Asn Ala Ser Ile Ile	
190 195 200	
CAC ATC CTC AAG TAC TTG ACT GGC TCA GCC AAG ACC TAC GCC AAC TCG	795
His Ile Leu Lys Tyr Leu Thr Gly Ser Ala Lys Thr Tyr Ala Asn Ser	
205 210 215 220	

- 60 -

GTC CAG GCG TAC GTG CAC GTC AAG GAC GTC GCG CTT GCC CAC GTC CTT	843
Val Gln Ala Tyr Val His Val Lys Asp Val Ala Leu Ala His Val Leu	
225 230 235	
GTC TTG GAG ACC CCA TCC GCC TCA GGC CGC TAT TTG TGC GCC GAG AGC	891
Val Leu Glu Thr Pro Ser Ala Ser Gly Arg Tyr Leu Cys Ala Glu Ser	
240 245 250	
GTC CTC CAC CGT GGC GAT GTG GTG GAA ATC CTT GCC AAG TTC TTC CCT	939
Val Leu His Arg Gly Asp Val Val Glu Ile Leu Ala Lys Phe Phe Pro	
255 260 265	
GAG TAT AAT GTA CCG ACC AAG TGC TCT GAT GAG GTG AAC CCA AGA GTA	987
Glu Tyr Asn Val Pro Thr Lys Cys Ser Asp Glu Val Asn Pro Arg Val	
270 275 280	
AAA CCA TAC AAG TTC TCC AAC CAG AAG CTG AGA GAC TTG GGG CTC GAG	1035
Lys Pro Tyr Lys Phe Ser Asn Gln Lys Leu Arg Asp Leu Gly Leu Glu	
285 290 295 300	
TTC ACC CCG GTG AAG CAG TGC CTG TAC GAA ACT GTC AAG AGC TTG CAG	1083
Phe Thr Pro Val Lys Gln Cys Leu Tyr Glu Thr Val Lys Ser Leu Gln	
305 310 315	
GAG AAA GGC CAC CTA CCA GTC CCC TCC CCG CCG GAA GAT TCG GTG CGT	1131
Glu Lys Gly His Leu Pro Val Pro Ser Pro Pro Glu Asp Ser Val Arg	
320 325 330	
ATT CAG GGA TGATCTTAGA TCCATCACGG TCGCATTTG TAATCCGGAG	1180
Ile Gln Gly	
335	
AAATGAGAGA AACATGTGGG AATTTGTTTG TACTTTTCTA AGTCAAACCT GGAGATACCA	1240
ACCCTGAGTT CTGCATTGGA ATGGAAGTTG TCAATTGTTC CAAAAAAAAA AAAAAAA	1297

- 61 -

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 10:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 335 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

Met Pro Val Asp Ala Leu Pro Gly Ser Gly Gln Thr Val Cys Val Thr
1 5 10 15

Gly Ala Gly Gly Phe Ile Ala Ser Trp Ile Val Lys Leu Leu Leu Glu
20 25 30

Arg Gly Tyr Thr Val Arg Gly Thr Val Arg Asn Pro Asp Asp Pro Lys
35 40 45

Asn Gly His Leu Arg Asp Leu Glu Gly Ala Ser Glu Arg Leu Thr Leu
50 55 60

Tyr Lys Gly Asp Leu Met Asp Asp Gly Ser Leu Glu Glu Ala Ile Lys
65 70 75 80

Gly Cys Asp Gly Val Val His Thr Ala Ser Pro Val Thr Asp Asp Pro
85 90 95

Glu Gln Met Val Glu Pro Ala Val Ile Gly Thr Lys Asn Val Ile Val
100 105 110

Ala Ala Ala Glu Ala Lys Val Arg Arg Val Val Phe Thr Ser Ser Ile
115 120 125

Gly Ala Val Thr Met Asp Pro Asn Arg Ala Asp Val Val Val Asp Glu
130 135 140

- 62 -

Ser Cys Trp Ser Asp Leu Glu Phe Cys Lys Ser Thr Lys Asn Trp Tyr
145 150 155 160

Cys Tyr Gly Lys Ala Val Ala Glu Lys Ala Ala Trp Pro Glu Gly Lys
165 170 175

Glu Arg Gly Val Asp Leu Val Val Ile Asn Pro Val Leu Val Leu Gly
180 185 190

Pro Leu Leu Gln Ser Thr Ile Asn Ala Ser Ile Ile His Ile Leu Lys
195 200 205

Tyr Leu Thr Gly Ser Ala Lys Thr Tyr Ala Asn Ser Val Gln Ala Tyr
210 215 220

Val His Val Lys Asp Val Ala Leu Ala His Val Leu Val Leu Glu Thr
225 230 235 240

Pro Ser Ala Ser Gly Arg Tyr Leu Cys Ala Glu Ser Val Leu His Arg
245 250 255

Gly Asp Val Val Glu Ile Leu Ala Lys Phe Phe Pro Glu Tyr Asn Val
260 265 270

Pro Thr Lys Cys Ser Asp Glu Val Asn Pro Arg Val Lys Pro Tyr Lys
275 280 285

Phe Ser Asn Gln Lys Leu Arg Asp Leu Gly Leu Glu Phe Thr Pro Val
290 295 300

Lys Gln Cys Leu Tyr Glu Thr Val Lys Ser Leu Gln Glu Lys Gly His
305 310 315 320

Leu Pro Val Pro Ser Pro Pro Glu Asp Ser Val Arg Ile Gln Gly
325 330 335

REVENDECATIONS

1. Utilisation de séquences nucléotidiques recombinantes contenant une (ou plusieurs) région(s) codante(s), cette (ces) région(s) codante(s) étant
5 constituée(s):

- d'une séquence nucléotidique codant pour un ARN messager (ARNm), cet ARNm codant lui-même pour une cinnamoyl CoA réductase (CCR) chez les plantes, ou d'un fragment de la séquence nucléotidique susmentionnée, ce fragment codant pour un ARNm, cet ARNm codant lui-même pour un
10 fragment d'une CCR chez les plantes, ce fragment de CCR présentant une activité enzymatique équivalente à celle de la CCR susmentionnée, ou d'une séquence nucléotidique dérivée de la séquence nucléotidique susmentionnée, ou dérivée du fragment susmentionné, notamment par mutation et/ou addition, et/ou suppression, et/ou substitution d'un ou plusieurs nucléotides, cette
15 séquence dérivée codant pour un ARNm, cet ARNm codant lui-même pour une protéine dérivée présentant une activité enzymatique équivalente à celle de la CCR susmentionnée, ou

- d'une séquence nucléotidique complémentaire de tout ou partie de la séquence nucléotidique codant pour un ARNm, ou du fragment de cette
20 séquence, ou de la séquence dérivée de ces derniers, tels que définis ci-dessus, cette séquence complémentaire codant pour un ARNm antisens susceptible de s'hybrider avec l'un des ARNm susmentionnés, pour la transformation de cellules végétales en vue de l'obtention de plantes transgéniques au sein desquelles la biosynthèse des lignines est régulée soit
25 dans le sens d'une augmentation, soit dans le sens d'une diminution des teneurs en lignines produites, par rapport aux teneurs normales en lignines produites chez les plantes.

2. Utilisation de séquences nucléotidiques recombinantes selon la
30 revendication 1, caractérisée en ce qu'elles contiennent à titre de région codante, tout ou partie d'une séquence nucléotidique choisie parmi les suivantes:

- la séquence nucléotidique représentée par SEQ ID NO 1, codant pour un ARNm, cet ARNm codant lui-même pour la CCR d'eucalyptus représentée
35 par SEQ ID NO 2,

- la séquence nucléotidique représentée par SEQ ID NO 3, codant pour un ARNm, cet ARNm codant lui-même pour la CCR de peuplier représentée par SEQ ID NO 4,

- 64 -

- la séquence nucléotidique représentée par SEQ ID NO 5, codant pour un ARNm, cet ARNm codant lui-même pour la CCR de fétuque représentée par SEQ ID NO 6,

5 - la séquence nucléotidique représentée par SEQ ID NO 7, codant pour un ARNm, cet ARNm codant lui-même pour la CCR de tabac représentée par SEQ ID NO 8,

10 - la séquence nucléotidique complémentaire de celle représentée par SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 5 ou SEQ ID NO 7, cette séquence complémentaire codant pour un ARNm antisens susceptible de s'hybrider avec l'ARNm codé par les séquences SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 5 et SEQ ID NO 7 respectivement,

15 - la séquence nucléotidique dérivée de la séquence représentée par SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 5 ou SEQ ID NO 7, notamment par mutation et/ou addition, et/ou suppression, et/ou substitution d'un ou plusieurs nucléotides, cette séquence dérivée codant soit pour un ARNm codant lui-même pour la CCR représentée par SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 6 ou SEQ ID NO 8 respectivement, ou pour une protéine dérivée de ces dernières et présentant une activité enzymatique équivalente à celle desdites CCR chez les plantes, notamment la séquence nucléotidique dérivée de la séquence SEQ ID NO 1, et représentée par SEQ ID NO 9, cette dernière codant pour un ARNm, cet ARNm codant lui-même pour une protéine représentée par SEQ ID NO 10 dérivée de la CCR d'eucalyptus susmentionnée,

20 - la séquence nucléotidique dérivée de la séquence nucléotidique complémentaire susmentionnée, par mutation et/ou addition, et/ou suppression, et/ou substitution d'un ou plusieurs nucléotides, cette séquence dérivée codant pour un ARNm antisens susceptible de s'hybrider avec un des ARNm susmentionnés.

30 3. Séquence d'ADN, caractérisée en ce qu'elle comprend à titre de région codante:

 - la séquence nucléotidique représentée par SEQ ID NO 1, codant pour un ARNm, cet ARNm codant lui-même pour la CCR représentée par SEQ ID NO 2, ou

35 - un fragment de la séquence nucléotidique susmentionnée, ce fragment codant pour un fragment de la CCR représentée par SEQ ID NO 2, ce fragment de CCR présentant une activité enzymatique équivalente à celle de la CCR susmentionnée, ou

- 65 -

- toute séquence nucléotidique dérivée de la séquence représentée par SEQ ID NO 1 susmentionnée, ou d'un fragment tel que décrit ci-dessus de cette séquence, notamment par mutation et/ou addition, et/ou suppression, et/ou substitution d'un ou plusieurs nucléotides, cette séquence dérivée codant
5 pour un ARNm codant lui-même pour la CCR représentée par SEQ ID NO 2, ou pour une protéine dérivée de cette dernière et présentant une activité enzymatique équivalente à celle de ladite CCR chez les plantes, notamment la séquence nucléotidique dérivée de la séquence SEQ ID NO 1, et représentée par SEQ ID NO 9, cette dernière codant pour un ARNm, cet ARNm codant
10 lui-même pour une protéine représentée par SEQ ID NO 10 dérivée de la CCR d'eucalyptus.

4. Séquence d'ADN, caractérisée en ce qu'elle comprend à titre de région codante:

15 - la séquence nucléotidique représentée par SEQ ID NO 3, codant pour ARNm, cet ARNm codant lui-même pour la CCR représentée par SEQ ID NO 4, ou

- un fragment de la séquence nucléotidique susmentionnée, ce fragment codant pour un fragment de la CCR représentée par SEQ ID NO 4, ce
20 fragment de CCR présentant une activité enzymatique équivalente à celle de la CCR susmentionnée, ou

- toute séquence nucléotidique dérivée de la séquence représentée par SEQ ID NO 3, susmentionnée, ou d'un fragment tel que décrit ci-dessus de cette séquence, notamment par mutation et/ou addition, et/ou suppression,
25 et/ou substitution d'un ou plusieurs nucléotides, cette séquence dérivée codant pour un ARNm codant lui-même pour la CCR représentée par SEQ ID NO 4, ou pour une protéine dérivée de cette dernière et présentant une activité enzymatique équivalente à celle de ladite CCR chez les plantes.

30 5. Séquence d'ADN, caractérisée en ce qu'elle comprend à titre de région codante:

- la séquence nucléotidique représentée par SEQ ID NO 5, codant pour ARNm, cet ARNm codant lui-même pour la CCR représentée par
SEQ ID NO 6, ou

35 - un fragment de la séquence nucléotidique susmentionnée, ce fragment codant pour un fragment de la CCR représentée par SEQ ID NO 6, ce fragment de CCR présentant une activité enzymatique équivalente à celle de la CCR susmentionnée, ou

- 66 -

5 - toute séquence nucléotidique dérivée de la séquence représentée par SEQ ID NO 5, susmentionnée, ou d'un fragment tel que décrit ci-dessus de cette séquence, notamment par mutation et/ou addition, et/ou suppression, et/ou substitution d'un ou plusieurs nucléotides, cette séquence dérivée codant pour un ARNm codant lui-même pour la CCR représentée par SEQ ID NO 6, ou pour une protéine dérivée de cette dernière et présentant une activité enzymatique équivalente à celle de ladite CCR chez les plantes.

10 6. Séquence d'ADN, caractérisée en ce qu'elle comprend à titre de région codante:

- la séquence nucléotidique représentée par SEQ ID NO 7, codant pour ARNm, cet ARNm codant lui-même pour la CCR représentée par SEQ ID NO 8, ou

15 - un fragment de la séquence nucléotidique susmentionnée, ce fragment codant pour un fragment de la CCR représentée par SEQ ID NO 8, ce fragment de CCR présentant une activité enzymatique équivalente à celle de la CCR susmentionnée, ou

20 - toute séquence nucléotidique dérivée de la séquence représentée par SEQ ID NO 7, susmentionnée, u d'un fragment tel que décrit ci-dessus de cette séquence, notamment par mutation et/ou addition, et/ou suppression, et/ou substitution d'un ou plusieurs nucléotides, cette séquence dérivée codant pour un ARNm codant lui-même pour la CCR représentée par SEQ ID NO 8, ou pour une protéine dérivée de cette dernière et présentant une activité enzymatique équivalente à celle de ladite CCR chez les plantes.

25

7. Séquence d'ADN, caractérisée en ce qu'elle comprend à titre de région codante:

30 - la séquence nucléotidique complémentaire de celle représentée par SEQ ID NO 1, cette séquence complémentaire codant pour un ARNm antisens susceptible de s'hybrider avec l'ARNm codant lui-même pour la CCR représentée par SEQ ID NO 2, à savoir l'ARNm codé par la séquence représentée par SEQ ID NO 1, ou codé par une séquence dérivée de cette dernière, telle que définie ci-dessus, ou

35 - un fragment de la séquence complémentaire susmentionnée, ce fragment de séquence codant pour un ARNm antisens susceptible de s'hybrider avec l'ARNm codant lui-même pour la CCR représentée par SEQ ID NO 2, tel que défini ci-dessus, ou

- 67 -

- toute séquence nucléotidique dérivée de la séquence complémentaire susmentionnée, ou du fragment de cette séquence complémentaire tel que décrit ci-dessus, notamment par mutation et/ou addition, et/ou suppression, et/ou substitution d'un ou plusieurs nucléotides, cette séquence dérivée codant
5 pour un ARNm antisens susceptible de s'hybrider avec l'ARNm susmentionné, notamment la séquence complémentaire de celle représentée par SEQ ID NO 9.

8. Séquence d'ADN, caractérisée en ce qu'elle comprend à titre de
10 région codante:

- la séquence nucléotidique complémentaire de celle représentée par SEQ ID NO 3, cette séquence complémentaire codant pour un ARNm antisens susceptible de s'hybrider avec l'ARNm codant lui-même pour la CCR représentée par SEQ ID NO 4, à savoir l'ARNm codé par la séquence
15 représentée par SEQ ID NO 3, ou codé par une séquence dérivée de cette dernière, telle que définie ci-dessus, ou

- un fragment de la séquence complémentaire susmentionnée, ce fragment de séquence codant pour un ARNm antisens susceptible de s'hybrider avec l'ARNm codant lui-même pour la CCR représentée par
20 SEQ ID NO 4, tel que défini ci-dessus, ou

- toute séquence nucléotidique dérivée de la séquence complémentaire susmentionnée, ou du fragment de cette séquence complémentaire tel que décrit ci-dessus, notamment par mutation et/ou addition, et/ou suppression, et/ou substitution d'un ou plusieurs nucléotides, cette séquence dérivée codant
25 pour un ARNm antisens susceptible de s'hybrider avec l'ARNm susmentionné.

9. Séquence d'ADN, caractérisée en ce qu'elle comprend à titre de région codante:

- la séquence nucléotidique complémentaire de celle représentée par
30 SEQ ID NO 5, cette séquence complémentaire codant pour un ARNm antisens susceptible de s'hybrider avec l'ARNm codant lui-même pour la CCR représentée par SEQ ID NO 6, à savoir l'ARNm codé par la séquence représentée par SEQ ID NO 5, ou codé par une séquence dérivée de cette dernière, telle que définie ci-dessus, ou

- un fragment de la séquence complémentaire susmentionnée, ce fragment de séquence codant pour un ARNm antisens susceptible de s'hybrider avec l'ARNm codant lui-même pour la CCR représentée par
35 SEQ ID NO 5, tel que défini ci-dessus, ou

- 68 -

5 - toute séquence nucléotidique dérivée de la séquence complémentaire susmentionnée, ou du fragment de cette séquence complémentaire tel que décrit ci-dessus, notamment par mutation et/ou addition, et/ou suppression, et/ou substitution d'un ou plusieurs nucléotides, cette séquence dérivée codant pour un ARNm antisens susceptible de s'hybrider avec l'ARNm susmentionné.

10 10. Séquence d'ADN, caractérisée en ce qu'elle comprend à titre de région codante:

10 - la séquence nucléotidique complémentaire de celle représentée par SEQ ID NO 7, cette séquence complémentaire codant pour un ARNm antisens susceptible de s'hybrider avec l'ARNm codant lui-même pour la CCR représentée par SEQ ID NO 8, à savoir l'ARNm codé par la séquence représentée par SEQ ID NO 7, ou codé par une séquence dérivée de cette dernière, telle que définie ci-dessus, ou

15 - un fragment de la séquence complémentaire susmentionnée, ce fragment de séquence codant pour un ARNm antisens susceptible de s'hybrider avec l'ARNm codant lui-même pour la CCR représentée par SEQ ID NO 7, tel que défini ci-dessus, ou

20 - toute séquence nucléotidique dérivée de la séquence complémentaire susmentionnée, ou du fragment de cette séquence complémentaire tel que décrit ci-dessus, notamment par mutation et/ou addition, et/ou suppression, et/ou substitution d'un ou plusieurs nucléotides, cette séquence dérivée codant pour un ARNm antisens susceptible de s'hybrider avec l'ARNm susmentionné.

25 11. ARNm codé par une séquence d'ADN selon l'une des revendications 3 à 10, et plus particulièrement:

30 - l'ARNm codé par la séquence d'ADN représentée par SEQ ID NO 1, ou codé par un fragment ou une séquence dérivée tels que définis ci-dessus, ledit ARNm étant susceptible de coder à son tour pour la CCR présente chez l'eucalyptus, telle que représentée par SEQ ID NO 2, ou pour un fragment de cette CCR ou une protéine dérivée tels que définis dans la revendication 1, notamment pour la protéine représentée par SEQ ID NO 10,

35 - l'ARNm codé par la séquence d'ADN représentée par SEQ ID NO 3, ou codé par un fragment ou une séquence dérivée tels que définis ci-dessus, ledit ARNm étant susceptible de coder à son tour pour la CCR présente chez le peuplier, telle que représentée par SEQ ID NO 4, ou pour un fragment de cette CCR ou une protéine dérivée tels que définis dans la revendication 1,

- 69 -

5 - l'ARNm codé par la séquence d'ADN représentée par SEQ ID NO 5, ou codé par un fragment ou une séquence dérivée tels que définis ci-dessus, ledit ARNm étant susceptible de coder à son tour pour la CCR présente chez la fétuque, telle que représentée par SEQ ID NO 6, ou pour un fragment de cette CCR ou une protéine dérivée tels que définis dans la revendication 1,

10 - l'ARNm codé par la séquence d'ADN représentée par SEQ ID NO 7, ou codé par un fragment ou une séquence dérivée tels que définis ci-dessus, ledit ARNm étant susceptible de coder à son tour pour la CCR présente chez le tabac, telle que représentée par SEQ ID NO 8, ou pour un fragment de cette CCR ou une protéine dérivée tels que définis dans la revendication 1.

15 12. ARNm antisens, caractérisé en ce qu'il comprend des nucléotides complémentaires de la totalité ou d'une partie seulement des nucléotides constituant un ARNm selon la revendication 11, et en ce qu'il est susceptible de s'hybrider avec ce dernier.

20 13. CCR telle que présente dans les cellules d'eucalyptus de peuplier, de fétuque élevée ou de tabac, et représentée par SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 6 ou SEQ ID NO 8 respectivement, ou toute protéine dérivée de ces dernières, notamment par addition, et/ou suppression, et/ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés, ou tout fragment issu desdites CCR ou de leurs séquences dérivées, lesdits fragments et séquences dérivées étant susceptible de posséder une activité enzymatique équivalente à celle des CCR susmentionnées.

25 14. Séquences nucléotidiques codant pour les CCR représentées par SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 6 ou SEQ ID NO 8, ou toute séquence dérivée ou fragment de ces dernières, selon la revendication 13, lesdites séquences nucléotidiques étant caractérisées en ce qu'elles
30 correspondent à tout ou partie des séquences représentées par SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 5 ou SEQ ID NO 7 respectivement, ou à toute séquence dérivée de ces dernières par dégénérescence du code génétique, et étant néanmoins susceptibles de coder pour une CCR ou séquence dérivée ou fragment de cette dernière, tels que définis dans la revendication 13.

35 15. Complexes formés entre un ARNm antisens selon la revendication 12, et un ARNm selon la revendication 11.

- 70 -

16. Séquence nucléotidique recombinante, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une séquence d'ADN selon l'une des revendications 3 à 6, susceptible de coder pour un ARNm lui-même susceptible de coder pour une CCR chez les plantes, ladite séquence selon l'une des revendications 3 à 6 étant insérée dans une séquence hétérologue.

17. Séquence nucléotidique recombinante, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une séquence d'ADN complémentaire selon l'une des revendications 7 à 10, insérée dans une séquence hétérologue, ladite séquence d'ADN complémentaire codant pour un ARNm antisens susceptible de s'hybrider avec l'ARNm codant pour une CCR chez les plantes.

18. Séquence nucléotidique recombinante selon la revendication 16 ou la revendication 17, caractérisée en ce qu'elle comprend les éléments nécessaires pour réguler l'expression de la séquence nucléotidique selon l'une des revendications 3 à 6, ou de sa séquence complémentaire selon l'une des revendications 7 à 10, notamment un promoteur et un terminateur de la transcription de ces séquences, et le cas échéant, au moins une séquence d'ADN codant pour tout ou partie d'une autre enzyme que la CCR, qui se trouve être impliquée dans une étape de biosynthèse des lignines chez les plantes, notamment l'ARNm codant lui-même pour l'alcool cinnamylique deshydrogénase (CAD), ou au moins une séquence codant pour tout ou partie de l'ARNm antisens susceptible de s'hybrider avec l'ARNm susmentionné, notamment avec l'ARNm codant pour la CAD.

19. Vecteur recombinant caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique recombinante selon l'une des revendications 16 à 18, intégrée dans l'un de ses sites de son génome non essentiels pour sa répllication.

20. Procédé de régulation de la biosynthèse de lignines chez les plantes, soit par diminution, soit par augmentation des teneurs en lignines produites, par rapport aux teneurs normales en lignines produites chez des plantes, ledit procédé comprenant une étape de transformation de cellules de ces plantes à l'aide d'un vecteur contenant:

- une séquence nucléotidique codant pour un ARNm, cet ARNm codant lui-même pour une CCR chez les plantes, ou d'un fragment de la séquence nucléotidique susmentionnée, ce fragment codant pour un ARNm, cet ARNm codant lui-même pour un fragment d'une CCR chez les plantes, ce fragment de

- 71 -

CCR présentant une activité enzymatique équivalente à celle de la CCR susmentionnée, ou d'une séquence nucléotidique dérivée de la séquence nucléotidique susmentionnée, ou dérivée du fragment susmentionné, notamment par mutation et/ou addition, et/ou suppression, et/ou substitution
5 d'un ou plusieurs nucléotides, cette séquence dérivée codant pour un ARNm, cet ARNm codant lui-même pour une protéine dérivée présentant une activité enzymatique équivalente à celle de la CCR susmentionnée, ou

- une séquence nucléotidique complémentaire de tout ou partie de la séquence nucléotidique codant pour un ARNm, ou du fragment de cette
10 séquence, ou de la séquence dérivée de ces derniers, tels que définis ci-dessus, cette séquence complémentaire codant pour un ARNm antisens susceptible de s'hybrider avec l'un des ARNm susmentionnés, notamment à l'aide d'un vecteur selon la revendication 19.

15 21. Procédé de diminution de la biosynthèse de lignine chez les plantes, et donc de diminution des teneurs en lignines produites par rapport aux teneurs normales en lignines produites chez les plantes, caractérisé en ce qu'il est effectué par transformation du génome de ces plantes, en y incorporant:

- au moins une séquence d'ADN selon l'une des revendications 7 à 10,
20 - et, le cas échéant, au moins une séquence d'ADN codant pour tout ou partie d'un ARNm antisens capable de s'hybrider à un ARNm codant pour une autre enzyme que la CCR, qui se trouve être impliquée dans une étape de la biosynthèse des lignines chez les plantes, notamment l'ARNm codant pour la CAD,

25 ladite transformation étant réalisée:

- soit à l'aide d'un vecteur recombinant selon la revendication 19, contenant une séquence nucléotidique recombinante selon la revendication 17 ou la revendication 18,

- soit à l'aide de plusieurs vecteurs recombinants dont l'un au moins
30 contient une séquence nucléotidique recombinante selon la revendication 17, tandis que l' (ou les) autre(s) vecteur(s) recombinant(s) contien(nen)t une séquence d'ADN codant pour un ARNm antisens capable de s'hybrider à un ARNm codant pour une autre enzyme que la CCR, telle que définie ci-dessus.

35 22. Procédé de diminution de la biosynthèse de lignine chez les plantes, et donc de diminution des teneurs en lignines produites par rapport aux teneurs normales en lignines produites chez les plantes, caractérisé en ce qu'il est effectué par transformation du génome de ces plantes, en y incorporant:

- 72 -

- au moins une séquence d'ADN selon la revendication 3 à 6,
- et, le cas échéant, au moins une séquence d'ADN codant pour tout ou partie d'une autre enzyme que la CCR, qui se trouve être impliquée dans une étape de la biosynthèse des lignines chez les plantes, notamment une séquence d'ADN codant pour tout ou partie de la CAD,
5 ladite transformation étant réalisée:

- soit à l'aide d'un vecteur recombinant selon la revendication 19, contenant la séquence nucléotidique recombinante selon la revendication 16 ou la revendication 18,

10 - soit à l'aide de plusieurs vecteurs recombinants dont l'un au moins contient une séquence nucléotidique recombinante selon la revendication 16, tandis que l' (ou les) autre(s) vecteur(s) recombinant(s) contien(nen)t une séquence d'ADN codant pour tout ou partie d'une enzyme autre que la CCR, telle que définie ci-dessus.

15

23. Procédé d'augmentation de la biosynthèse de lignine chez les plantes, et donc d'augmentation des teneurs en lignines produites par rapport aux teneurs normales en lignines produites chez les plantes, caractérisé en ce qu'il est effectué par transformation du génome de ces plantes, en y incorporant:

20

- au moins une séquence d'ADN selon l'une des revendications 3 à 6,
- et, le cas échéant, au moins une séquence d'ADN codant pour une autre enzyme que la CCR, qui se trouve être impliquée dans une étape de la biosynthèse des lignines chez les plantes, notamment une séquence d'ADN codant pour la CAD,
25 ladite transformation étant réalisée:

25

- soit à l'aide d'un vecteur recombinant selon la revendication 19, contenant la séquence nucléotidique recombinante selon la revendication 16 ou la revendication 18,

30

- soit à l'aide de plusieurs vecteurs recombinants dont l'un au moins contient une séquence nucléotidique recombinante selon la revendication 16, tandis que l' (ou les) autre(s) vecteur(s) recombinant(s) contien(nen)t une séquence d'ADN codant pour tout ou partie d'une enzyme autre que la CCR, telle que définie ci-dessus.

35

24. Plantes ou fragments de plantes, notamment cellules, fruits, semences, pollen, transformés par incorporation dans leur génome d'au moins une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 3 à 10.

- 73 -

25. Polypeptides recombinants, notamment CCR recombinantes représentées par SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 6, ou SEQ ID NO 8, tels qu'obtenus par transformation de cellules végétales en intégrant de façon stable dans leur génome, une séquence nucléotidique recombinante selon l'une des revendications 16 à 18, notamment à l'aide d'un vecteur selon la revendication 19.

1/5

CCR
(1297 bps)

CCR

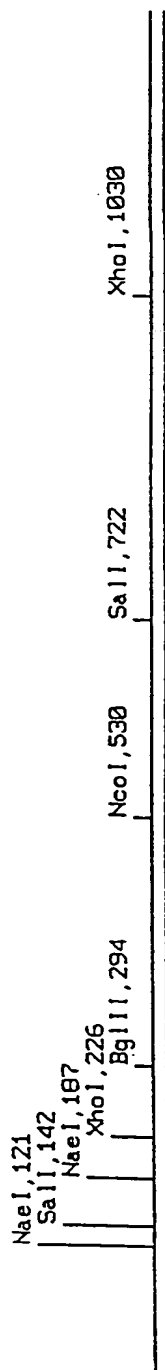


Figure 1

2/5

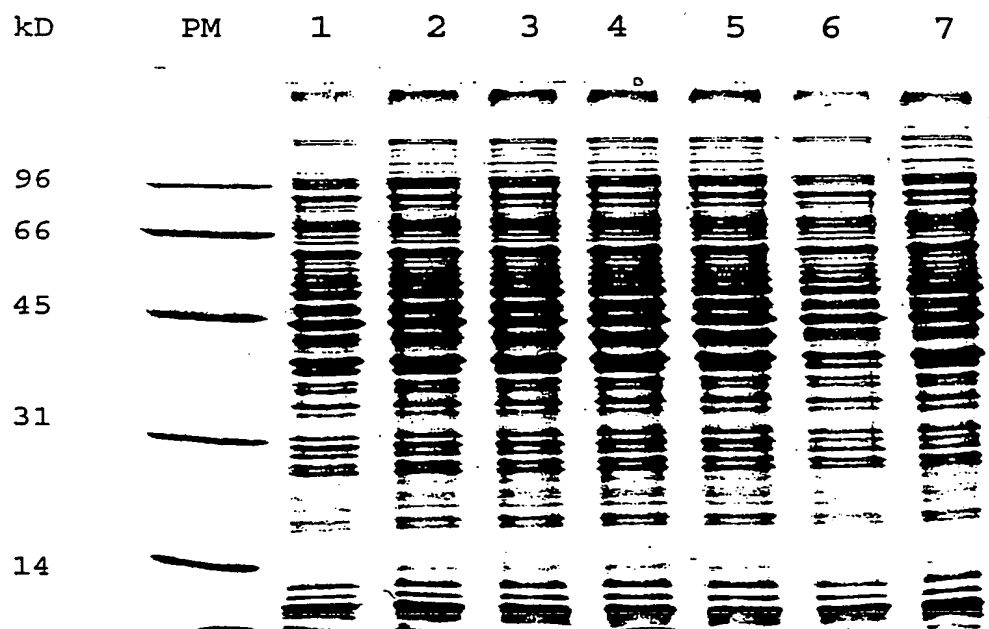


Figure 2

3/5

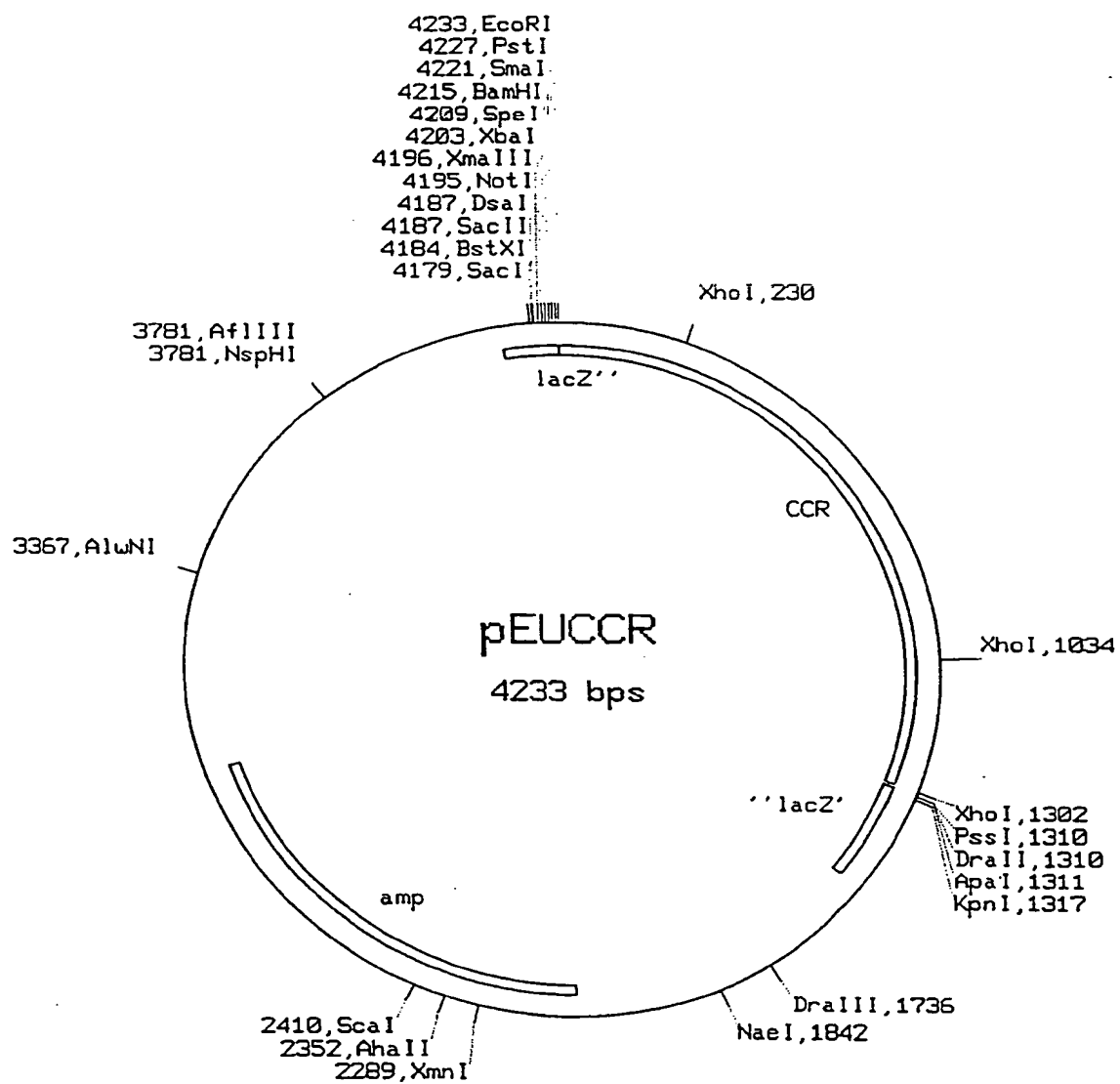


Figure 3

4/5

Construction d'un vecteur CCR sens

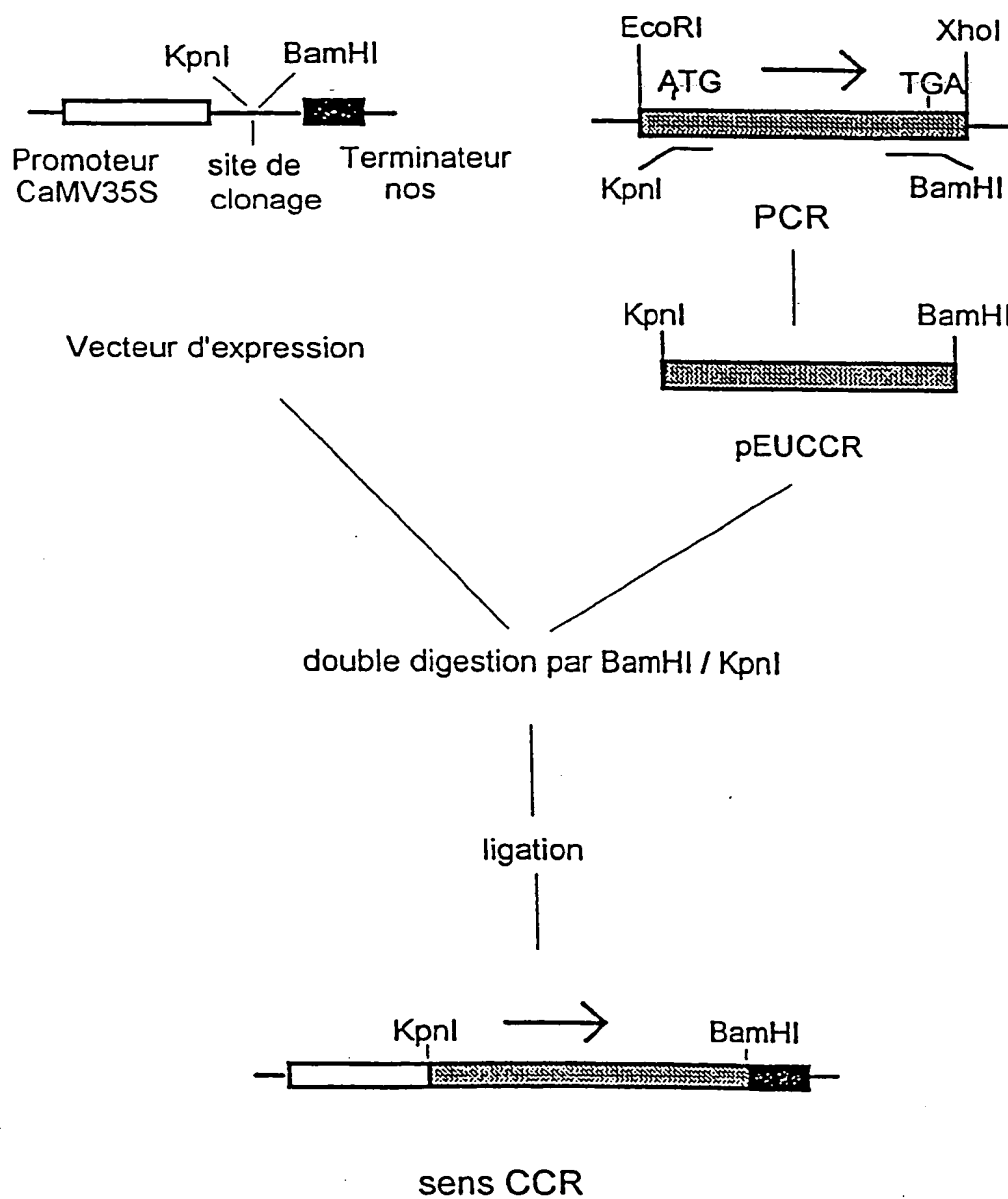


Figure 4

Construction d'un vecteur CCR antisens

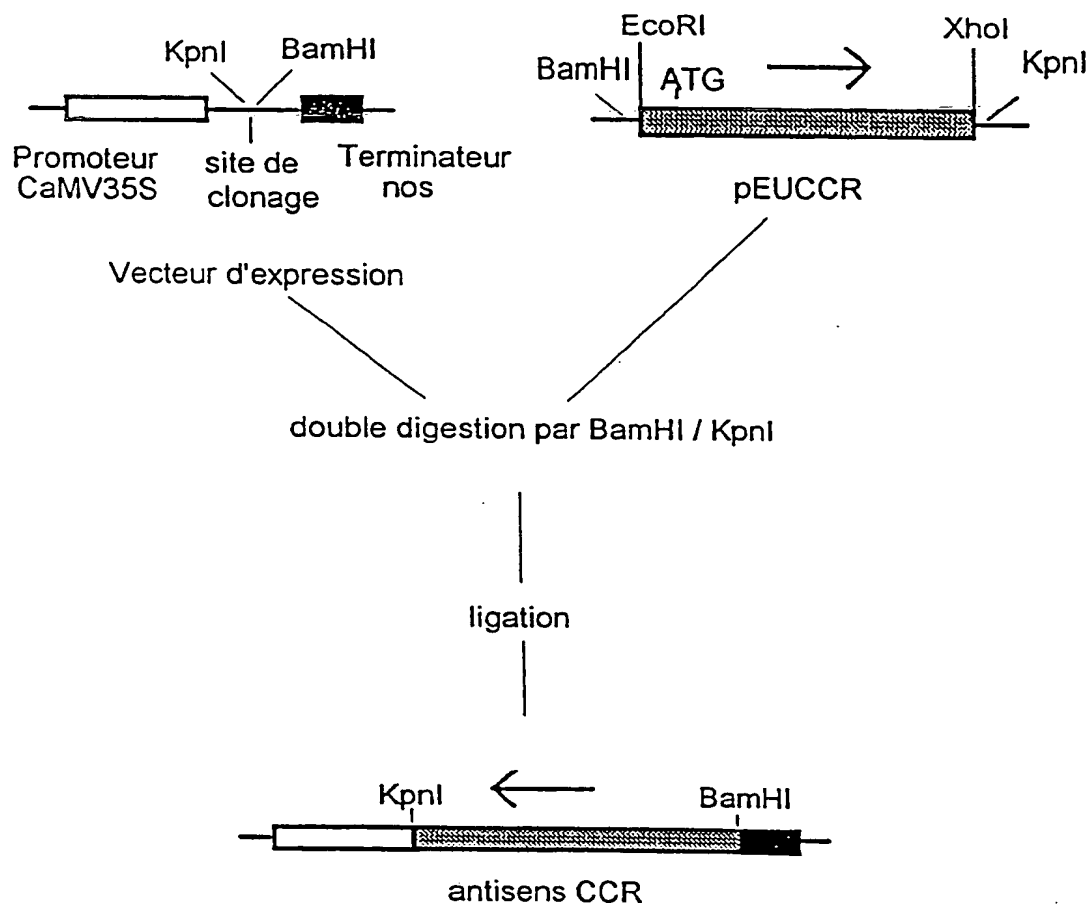


Figure 5